生命科学名著

〔美〕 M.T. 马迪根
J.M. 马丁克 等 编著

李明春 杨文博 主译

科学出版社 生命科学分社
编辑推荐
Editor's Choice

（上册）

(原书第11版)

BROCK微生物生物学

BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS

(11th Edition)

内含光盘

PEARSON Education

科学出版社
www.sciencep.com



左侧的插图是一张在澳大利亚西部某碱湖发现的碳酸钙生物膜（绿色）及其中生长的蓝细菌（黄色）的激光共聚焦扫描显微镜图。蓝细菌是光养原核生物，大都生存在强碱性和高盐度的碱湖水域中。它们是光能自养菌，正如绿色植物那样，它们能够进行光合作用并生产氧气。但是，蓝细菌比绿色植物在地球上早出现了几十亿年。这些微小的生物通过光合作用产生了高等生命进化所需的氧。从更加个人的观点来讲，如果没有蓝细菌的出现，你现在不可能读到这些文字，地球生物永远只能停留在细菌阶段。

蓝细菌只是你在第11版的Brock微生物生物学中将要了解的众多微生物类群之一。像以往一样，这本书是按照进化和多样性的原则串联成册的。以此为基础，结合最新的汇总资料，这本书揭示了当今微生物学的各个方面：普通微生物学和细胞生物学、分子生物学和遗传学、生物多样性和基因组学、代谢多样性和微生物生态学、免疫和宿主应答、微生物引起的疾病以及生物技术和工业微生物学。除了这些，你还会发现第11版Brock微生物生物学内容详尽，结构紧密，并且语言生动。因此，无论是学生还是教师都会从这本有趣的图书中受益匪浅。

欢迎来到21世纪的微生物学领域！你将喜欢上你所看到的东西！

全书内容

上册

下册

ISBN 978-7-03-021262-7

9 787030 212627 >

生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com

销售分类建议：生命科学/ 微生物学

定价：248.00 元（上下册，含光盘）

Brock 微生物生物学

（原书第 11 版）

（上　册）

BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS

(11th Edition)

〔美〕M. T. 马迪根　J. M. 马丁克 等　编著

李明春　杨文博　主译

科学出版社

北　京

图字：01-2006-7053 号

内 容 简 介

Brock Biology of Microorganisms 是美国优秀的微生物学教材。该书自 1970 年第 1 版到 2006 年的第 11 版，已有 36 年的历史。它以新颖、先进、严谨的内容，丰富精美的图片，启发式的知识结构和巧妙的构思，赢得了广大师生的青睐。

本书的内容博大精深，从微生物学基础，进化微生物学和微生物多样性，代谢多样性和微生物生态学，免疫学、致病性和宿主反应，微生物疾病，工业微生物学等六部分入手，详尽地介绍了微生物的结构、营养、代谢、遗传、生长和调控，主要的微生物疾病，微生物多样性，微生物生态，微生物进化等内容。

本书具有全面性、系统性和广泛性的特点，知识丰富、阐述清晰、简明易懂、条理性强、可读性强。可作为综合性大学、医学院校、农林院校、轻工业院校等生命科学、医学、药学等专业师生及相关研究人员的微生物学教材或参考书。

图书在版编目(CIP)数据

Brock 微生物生物学（原书第 11 版）（上下册）/（美）马迪根（M. T. Madigan）等编著；李明春，杨文博主译. —北京：科学出版社，2009
（生命科学名著）
ISBN 978-7-03-021262-7

Ⅰ. B… Ⅱ. ①马…②李…③杨… Ⅲ. 微生物学-高等学校-教材 Ⅳ. Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 029180 号

责任编辑：李 晓 王 静 席 慧/责任校对：陈玉凤
责任印制：钱玉芬/封面设计：陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

源海印刷有限责任公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2009 年 1 月第 一 版 开本：787 × 1092 1/16
2009 年 1 月第一次印刷 印张：97
印数：1—2 500 字数：2 181 000

定价：248.00 元
（上下册，含光盘）
（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

南开大学教材资助立项项目

译者名单

（按姓氏笔画排序）

马　挺	牛淑敏	白　钢	乔文涛	刘　方	
严　冰	李国强	李明春	肖　亮	宋存江	
杨文博	陈月华	张心平	张　峻	徐海津	
蔡　峻	潘　皎	魏东盛			



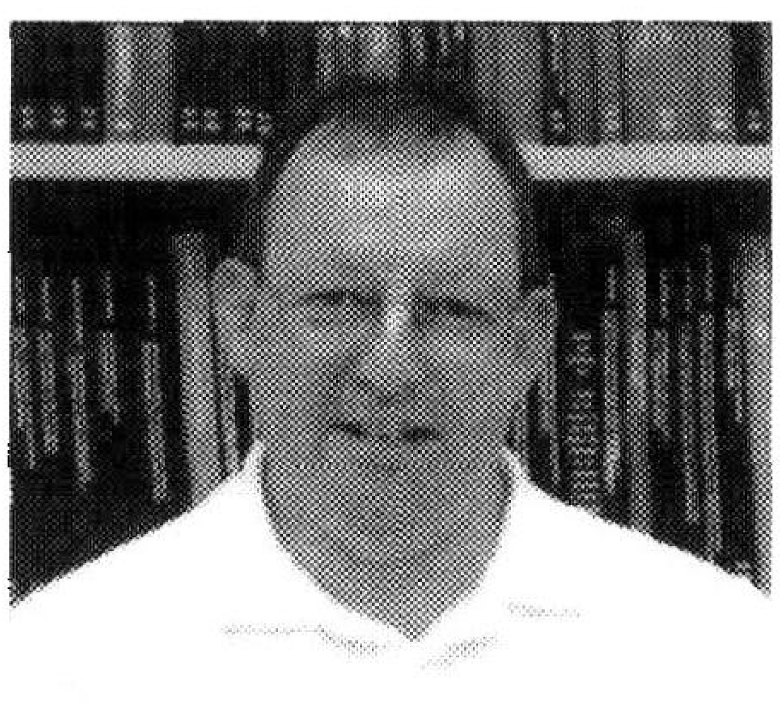
M. T. 马迪根　他把这本著作献给如图所示的两位老朋友——两只爱犬：威莉（Willie）和普拉姆(Plum)。他说："在过去的11年里，这两只可爱的动物给了我只有爱狗的人才能体会到的舒适和友谊。威莉总是可爱小狗的模范；相反，普拉姆（于2004年4月16日去世）被丢弃了。不过说实话，她曾经也有一颗善良的心，也爱人们。她静静地躺在那里看着我，我们从不经过那个地方，让她安息吧！"

J. M. 马丁克　他把这本书献给他以前和现在的学生。他说："那些最好的学生总是连续不断地从新的观点中提出问题，这不仅鼓励我教他们，而且增加了我的知识，同时提高了我的理解能力。我把这本书献给所有那些我曾荣幸教过的人，同时也感谢他们教给了我不少东西！"

作 者 简 介



M. T. 马迪根于 1971 年在 Stevens Point 的威斯康星州立大学（Wisconsin State University）获得生物学和教育学学士学位，并于 1974 年和 1976 年分别在威斯康星大学（University of Wisconsin，Madison）细菌学系获得硕士学位和博士学位。在 Thomas D. Brock 教授的指导下，他完成了有关温泉中光合细菌的生物学研究毕业论文。在随后的三年博士后研究中，他与 Howard Gest 在印第安纳大学（Indiana University）微生物系一起进行有关光合细菌的研究，之后受聘于 Cabondale 的南伊利诺斯大学（Southern Illinois University，SIU），任微生物学教授。从第 4 版（1984）开始，他就一直是《微生物生物学》的著者之一，同时他还讲授微生物学导论、细菌多样性以及诊断和应用微生物学的课程。1988 年和 1993 年分别当选为科学学院杰出教师和杰出研究者，2001 年获得美国大学杰出奖，2003 年获得了由美国微生物学会颁发的用于奖励卓越本科教学的 Carski 奖。他主要从事厌氧光合营养细菌的研究，尤其是那些能生活在极端环境的种类。他发表了 100 篇研究论文，并合著了一篇关于光合细菌的专题论文，同时也是《微生物年鉴》杂志（*Archives of Microbiology*）的编辑和主编。除了生命科学研究外，他的爱好还有读书、徒步旅行、植树、照顾狗和马。他和妻子南希、两条狗（Willie 和 Pupagano）、两匹马（Springer 和 Feivel）住在距离南伊利诺斯大学约五英里远的一个宁静的湖边。



J. M. 马丁克在克利夫兰州立大学（Cleveland State University）获得生物学理学学士学位。在大学期间，他在几个微生物学和免疫学实验室参与合作研究项目并获得研究经验。毕业后在卡西西储大学（Case Western Reserve University）作为实验室负责人工作了两年，他从事化脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）结构血清学和流行病学的研究。随后他去了布法罗的纽约州立大学（State University of New York）进行深造，从事抗体特异性和抗体独特型的研究，获得了微生学硕士和博士学位。博士后期间，在纽约的阿尔伯特爱因斯坦医学院（Albert Einstein College of Medicine）从事组织相容性复合蛋白的结构研究。从 1981 年起，他在 Carbondale 的南伊利诺斯大学（Southern Illinois University）微生物系工作，任主任和副教授。他的研究兴趣包括生长激素在免疫反应中的作用，大豆褐色根茎疾病的免疫诊断和结构突变引起的多肽组织相容性复合蛋白功能的变化。他为大学本科和研究生讲授免疫学课程，同时也负责教授普通微生物学课程中的免疫学、宿主防御和感染性疾病部分。2004 年，被评选为科学学院的杰出教师。他还是一名热心的高尔夫球手和自行车骑手。他和妻子朱迪——一所高等专科学校的教师住在 Carbondale。

译　者　序

《Brock 微生物生物学》（*Brock Biology of Microorganisms*）是美国优秀的微生物学教材之一，已被 Stanford University、Northwestern University、University of Chicago、Louisiana State University 等几百所世界著名大学作为本科生教材使用。

本书先后由美国 University of Wisconsin 的 Thomas D. Brock 教授、Southern Illinois University Carbondale 的 Michael T. Madigan 教授、John M. Martinko 教授和 Jack Parker 教授编著。自 1970 年出版第 1 版以来，已有 36 年的历史，平均每三年左右修订并推出一个新版，其频率之快，在高等教材中是少见的。这也从另一个角度说明本书适应微生物学领域迅猛发展的需要，能充分反映微生物学科发展的前沿问题、新的技术和成果，以此满足广大师生对新知识的渴求。*Brock Biology of Microorganisms* 以极其丰富、准确、前沿的内容，简洁明快的表格、色彩鲜艳的模式图和照片*，赢得了教师和学生的青睐。因此，Thomas D. Brock 也成了近 50 年来最杰出的科学家和教育家之一。

1980 年四川大学、南开大学、复旦大学、武汉大学、山东大学和云南大学六所院校联合翻译出版了该书第 2 版的中译本（人民教育出版社出版）；2001 年，南开大学翻译的第 8 版，由科学出版社出版发行，作为我国高校微生物教学的参考书，颇受读者欢迎。2006 年，第 11 版的问世，使我们再一次萌动了将其翻译成中文版的欲望，急切地想将这一最新教材介绍给我国更多的读者。因为该版不仅增加了更多更新的内容，而且其编排也较前几版更加合理，在将概念进行重新整合的同时，加入了更丰富多彩的图示进行阐述，所有的表格均被重新设计，使其内容更加容易理解，各章节的内容围绕着逻辑性和实用性进行了更新编排。总之，第 11 版更加便于师生的学习、理解和掌握。

第 11 版的知识内容仍然保持着博大精深的特点，不仅详细地介绍了微生物的结构与功能、营养、代谢、合成、分子遗传、生长和调控等方面的基础知识；同时还涉及微生物进化系统、微生物物种多样性、微生物代谢多样性、微生物生态、微生物有关的免疫学、致病性、宿主反应及与微生物疾病相关的内容；另外还阐述了微生物在遗传工程、生物技术、工业微生物等方面的应用。该书系统而翔实地体现了现代微生物学发展的水平。作者撷取了大量最新研究成果的资料，以流畅的文笔勾画出了分子微生物学的全貌。全面系统地阐述微生物生物学特性的书籍并不多见，正像它的书名一样，该书展示的是微生物的生物学。第 11 版附有最新的《伯杰氏系统细菌学手册》（2005 年）**，这对于我们从事教学及相关微生物学工作的科学研究人员是非常有用的。

本书是南开大学微生物学系长期从事科研教学第一线工作的老师共同努力的结果。参加本书翻译的主要人员有：马挺、牛淑敏、白钢、宋存江、乔文涛、刘方、肖亮、李

---

* 原书所有彩色图片均在随书所附的光盘中。——出版者

** 附录 B《伯杰氏系统细菌手册》在随书所附的光盘中。——出版者

明春、李国强、严冰、杨文博、陈月华、张心平、张峻（天津市农业科学院）、徐海津、蔡峻、潘皎、魏东盛。本书由杨文博教授统稿。另外，刘娜、胡丹、金映虹、刘莉、滑东辉同学也参加了部分初期翻译工作。在该书的翻译、校对、出版过程中，得到了邢来君教授的大力支持，同时也得到了科学出版社生物分社的热情帮助和支持，在此表示衷心地感谢！

由于本书篇幅大、参加翻译和校对工作的人员多，尽管我们力争前后用词一致、文笔统一，但仍然难免在译法、风格及少数术语等方面存在不足。限于时间、专业知识和翻译水平等原因，不妥之处在所难免，敬请专家、同行和读者予以指正，我们万分感谢！

李明春　杨文博
南开大学生命科学学院
2007 年 11 月于天津

前　言

我们处在微生物学的时代。在这一门令人振奋的科学中，几乎每天都有新的进展传来：新出现的传染病、新的生物体，以及为我们的探索过程提供便捷的新型工具。这就是当今微生物学发展的步伐。在这里，第 11 版的《Brock 微生物生物学》（*Brock Biology of Microorganisms*，BBOM）为您介绍了当今微生物学的最新发展动态。

这本教材可以追溯到 35 年前，由 Thomas D. Brock 著第 1 版《微生物生物学》（Prentice Hall 于 1970 年出版）起。该书只有一个目的：在现代科学框架中展示微生物学法则。第 11 版的 BBOM 延承了前十个版本的准确性和权威性。

现在的学生以及教师对于微生物学表现出前所未有的需求。信息是大量的，用于支撑学科的背景知识是具有重要意义的，而介绍微生物学的课程不能满足这样的要求。第 11 版 BBOM 的作者敏锐地意识到了这个问题，努力地编写了一本微生物学的教科书，侧重于实验法则的建立以及发表的地点、细节的完善以及对支撑观点进行的整合。我们希望您能认同。

第 11 版中的新内容是什么呢?

曾经受益于以往版本的 BBOM 读者会在新版本中看到一些以前见过的内容。然而，教师们将会发现第 11 版的 BBOM 更适于教学，学生也将会发现与以前的版本相比，它是一个更加宝贵的学习资源。

为了满足现在通过视图进行学习的学生的需求，第 11 版的 BBOM 在教学方法上进行了一些调整。第 11 版的 BBOM 的设计是基于第 10 版所没有的内容之上，加入了更多的图示进行阐述。该书从第 1 版就围绕章节的合理性和实用性进行编排和组织。但第 11 版，我们将每个章节编排成几个具有相关内容的部分，将概念进行整合，使其更容易理解和消化。与以往一样，在每个章节的开始有一个词汇表，用于阐述本章节中所包含的专业词汇。书中保留了概念检查，它提醒学生在进行下一章节学习之前应当停下来进行复习。在每个章节的最后，仍然会有复习题以及应用性学习问题。本书最后附有总词汇表和索引*。

传统的专题材料（boxed material）被放在了第 11 版 BBOM 新的“知识窗”（microbial sidebars）中，这些丰富的插图被设计成并写成了围绕章节核心内容的“有趣读物”。BBOM 第 11 版的表格完全进行了重新设计，使其中的内容更容易被理解和组织。因为像微生物学这样的学科非常依赖表格，新的表格的设计应该更适合学生和教师的学习和教学。本版中所做的变更使其更符合教育学方法，使教师和学生在阅读本书时都能受益。这包括醒目的标题、能够指引读者从文章到图片并再次回到文章中的红色图标，复习题中使用章节序号进行标注，这能够使得学生在回答每个问题之前及时更新他们的

---

* 本书的词汇表和索引均在随书所附的光盘中。——出版者

记忆。

全书是一个引人入胜的美术工程，每一张图都由一个新的工作室进行了美术设计，使彩图更加明亮、与众不同，和以前的图相比更加华美、吸引人、准确一致和具有教育性。此外，在第 11 版中第一次使用了高质量的、光滑的纸张对许多著名的显微照片及其他照片进行了印制，这是本书自第 1 版以来的传统。我们在图片中加入了明显的“能量箭头”，使读者能够快速发现我们提供的教学帮助。例如，在细胞反应中产生和消耗 ATP 的步骤，我们使用“能量箭头”——明亮的红色波浪箭头对这个反应进行标注来提醒学生。

尽管第 11 版 BBOM 要比前一版本在篇幅上要短，但它却包含新的内容。在每一章节中都能够找到新加入的内容，我们概略了该书中所包含的新内容：氧气的毒性形式（第 6 章）；σ 因子的多样性，一致序列，以及其他 RNA 聚合酶（第 7 章）；应急反应（第 8 章）；RNA 调节和核糖开关（第 8 章）；亚病毒颗粒（第 9 章）；远古生命形式的碳和能量代谢（第 11 章）；纳米古生菌的生物学（第 13 章）；RNA 加工和核酶（第 14 章）；线性 DNA 的复制（第 14 章）；基因组注释（第 15 章）；生物信息学分析和原核生物基因分布（第 15 章）；微阵列和转录组学（第 15 章）；古生菌病毒（第 16 章）；环境基因组学（第 18 章）；感染中的宿主危险因子（第 21 章）；流感、感冒和败血病（第 22 章）；自然免疫（第 22 章）；受体和免疫（第 23 章）；西尼罗病毒（第 27 章）；生物采样以及食物中毒（第 29 章）；严重急性呼吸系统综合征（第 25 章）；作为生物武器的炭疽（第 25 章）以及发酵食品（第 29 章）。

第 11 版 BBOM 配有一些补充材料*，其中包括一个网站（www. prenhall. com/madigan），提供在线多媒体资源、练习测试问题以及补充资源。对于教师来说，一张以 PowerPoint 格式含有书中所有表格和图片的 CD 是必要的，它将有利于提升课堂学习的积极性。对于那些在教室中应用这些内容的教师来说，幻灯片也是可以获得的。事实上，第 11 版 BBOM 的教师工具包为清晰、具有吸引力和激励性的教学发展提供了非常有用的工具。

致谢

您所见到的最终版本是许多人共同努力的结果。其中包括 Prentice Hall / Pearson 出版社的许多工作人员，特别是总编辑 Gary Carlson 和他的助手 Susan Zeigler 和 Jennifer Hart，以及著名的制作编辑 Debra Wechsler。Gary 是这个版本编辑时的指路明灯，而 Susan、Jennifer 和 Debra 维持着这项工作的进度，分别是这本书编辑和完成的“胶合剂”。同样要感谢 Ed Thomas（制作）在早期进行了辅助制作的工作。作者衷心地感谢为本书做美术工作的 Kenny Beck 和 Jay McElroy 以及多媒体编辑 Patrick Shriner 和 Crissy Dudonis，感谢 Jane Loftus（Clackamas，OR）针对整个手稿所做的优秀的编辑工作。

作者同样要感谢发行编辑 Jon Haber（New York，NY），专业助理并提供电子显微镜照片的 Deborah O. Jung（Carbondale，IL）以及校对者 Elizabeth McPherson

* 原书所配的补充材料未收录于本中译版中。——出版者

(University of Tennessee)和 David Crowley (University of California-Riverside)。本书封面上华丽的共聚焦显微照片则需要感谢 Gernot Arp 和 Christian Boeker，Universität Göttingen，Germany 以及 Carl Zeiss 公司，Jena，Germany。

我们两位作者还要感谢他们的研究生、同事和微生物学系成员在本书编写过程中的帮助和耐心。同样还要感谢我们的妻子 Nancy 和 Judy，在第 11 版 BBOM 的编写过程中由于作者需要大量的时间而不能同她们共度，但她们却表现出无尽的耐心，她们的爱、理解和支持使得作者能够在大量的工作中投入必要的时间。

最后，我们还要感谢许多个人的帮助，他们为本书的初稿进行了评阅或提供了新照片。名单如下：

Laurie Achenbach, *Southern Illinois University*
Richard Adler, *University of Michigan-Dearborn*
Karen Aguirre, *Clarkson University*
Stephen Aley, *University of Texas-El Paso*
Mary Allen, *Hartwick College*
Ricardo Amils, *University Autonoma, Madrid, Spain*
Robert Andrews, *Iowa State University*
Michael Benedik, *Taxas A&G University*
David Boone, *Portland State University*
Matt Boulton, *University of Michigan*
Cheryl Broadie, *Southern Illinois University*
Jean Cardinale, *Alfred University*
Jannice Carr, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
David Clark, *Southern Illinois University*
Rhonda Clark, *University of Calgary*
Morris Cooper, *Southern Illinois University School of Medicine*
David Crowley, *University of California-Riverside*
Mark Davis, *University of Evansville*
Michael Davis, *Central Connecticut State University*
Dennis Dean, *Virginia Tech University*
Arvind Dhople, *Florida Institute of Technology*
Biao Ding, *Ohio State University*
Rodney Donlan, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
Paul Dunlap, *University of Michigan*
Paul Edmonds, *Georgia Institute of Technology*
Elizabeth Ehrenfeld, *Southern Maine Community College*
Bruce Farnham, *Metropolitan State University-Denver*
Rebecca Ferrell, *Metropolitan State University-Denver*
Doug Fix, *Southern Illinois University*
Niels-Ulrik Frigaard, *Pennsylvania State University*

George Garrity, *Michigan State University*
Claire Geslin, *Université de Bretagne Occidentale, France*
Eric Grafman, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
Bonita Glatz, *Iowa State University*
Ricardo Guerrero, *University of Barcelona, Spain*
John Haddock, *Southern Illinois University*
Martin Hanczyc, *Harvard University*
Ernest Hanning, *University of Texas-Dallas*
Pamela Hathorn, *Midwestern University*
John Hayes, *Woods Hole Oceanographic Institution*
Lee Hughs, *University of North Texas*
Michael Ibba, *Ohio State University*
Johannes Imhoff, *Universität Kiel, Germany*
Mary Johnson, *Indiana University*
Deborah Jung, *Southern Illinois University*
Judy Kandel, *California State University-Fullerton*
Patrick Keeling, *University of British Columbia*
Joan Kiely, *SUNY-Stonybrook*
Arthur Koch, *Indiana University*
Allan Konopka, *Purdue University*
Vikki Kourkouliotis, *National Renewable Energy Laboratory*
Susan F. Koval, *University of Western Ontario*
Harry Kurtz, *Clemson University*
Sharon Long, *University of Massachusetts*
Bonnie Lustigman, *Montclair State University*
Mark Martin, *Occidental College*
William McCleary, *Brigham Young University*
Elizabeth McPerson, *University of Tennessee*
Ohad Medalia, *Max Planck Institut für Biochemie, Germany*
Jianghang Meng, *University of Maryland*
Eric Miller, *North Carolina State University*
Abraham Minisky, *Weizmann Institute of Science, Israel*
Ivan Oresnik, *University of Manitoba*
Jörg Overmann, *University of Munich, Germany*
Norm Pace, *University of Colorado*
Jack Parker, *Southern Illinois University*
Laurence Pelletier, *Max Planck Institut für Cell Biologie und Genetiks, Germany*
Michael Pfaller, *University of Iowa*
Reinhard Rachel, *Universität Regensburg, Germany*

Michael Rappe, *Oregon State University*
Chris Rensing, *University of Arizona*
Frank Roberto, *Idaho Environmental and Engineering Labs*
Craig Rouskey, *Southern Illinois University*
Jill Zeilstra Ryalls, *Oakland University*
Herb Schelhorn, *McMaster University*
Berhard Schink, *Universität Jonstanz, Germany*
Heide Schulz, *University of California-Davis*
Kate Scow, *University of California-Davis*
James Shapleigh, *Cornell University*
Jolynn Smith, *Southern Illinois University*
Jerry Sipe, *Adnerson University*
Nancy Spear, *Murphysboro, Illinois*
Julia Thompson, *American Society for Microbiology*
Sonia Tiquia, *University of Michigan*
David Tison, *Multicare Health Systems*
Paul Tomasek, *California State University-Northridge*
Amy Treonis, *Creighton University*
Michael Wagner, *University of Vienna, Austria*
David Ward, *Montana State University*
Joy Watts, *University of Maryland*
Mary Watwood, *Northern Arizona University*
Susan Wells, *Affymetrix, Santa Clara, California*
Carl Woese, *University of Illinois*
Gordon Wolfe, *California State University-Chico*
Alexander Worden, *University of Miami*
Mark Young, *Montana State University*
Stephen Zinder, *Cornell University*

书中所有的错误都是作者的责任。在过去的版本中，读者在使用中遇到错误总会与我们联系。尽管我们希望本书中不存在错误，但是没有哪本书能做到这点。所以，读者在第 11 版的使用过程中如果发现错误，也请与我们联系。我们希望您能喜欢本书。

Michael T. Madigan (madigan@micro. siu. edu)
John M. Martinko (martinko@micro. siu. edu)

（潘　皎　译，李明春　校）

简 要 目 录

第一部分 微生物学基础

第二部分 进化微生物学和微生物多样性

第三部分 代谢多样性和微生物生态学

第四部分 免疫学、致病性和宿主反应

第五部分　微生物疾病

第六部分　以微生物进行工业生产和科学研究

目　　录

第三部分　代谢多样性和微生物生态学

第五部分 微生物疾病

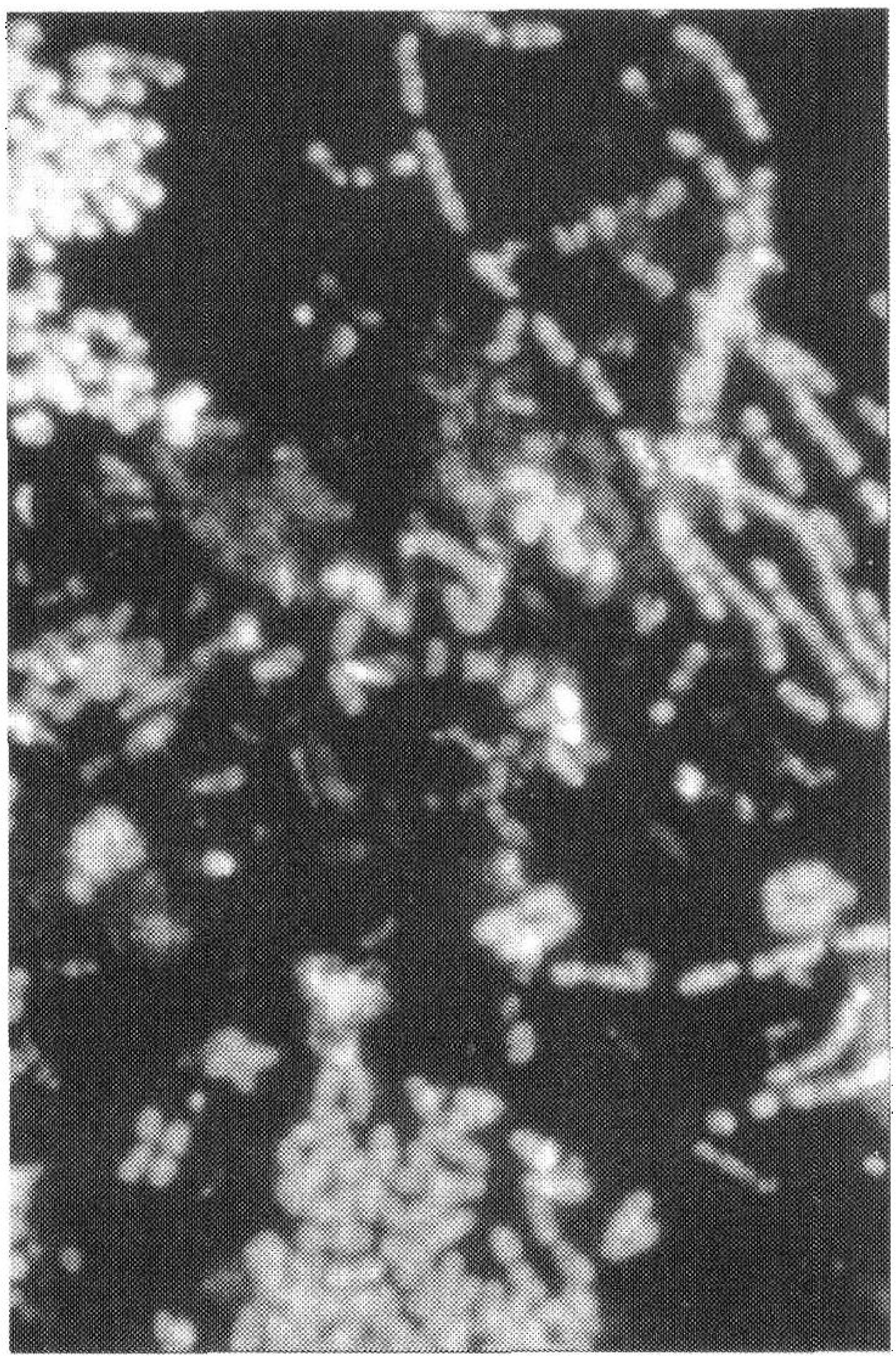
第六部分 以微生物进行工业生产和科学研究

第一部分

微生物学基础

1

微生物和微生物学



微生物是能独立生活的微小细胞，与人类一样，它们以群体的方式生存。

Ⅰ 微生物学简介

Ⅱ 微生物学简史

词汇表

细胞（cell）：生命的基本单位
细胞质（cytoplasm）：细胞的液体部分，细胞膜构成它的边界，但不包括细胞核（如果存在）
脱氧核糖核酸（DNA）：细胞和一些病毒的遗传物质
生态学（ecology）：在自然环境中对有机体的研究
生态系统（ecosystem）：指有机体和它们的非生物环境
富集培养（enrichment culture）：采用特殊培养基和培养条件从自然界中分离微生物的一种方法
酶（enzyme）：加速化学反应的蛋白质催化剂
生境（habitat）：微生物群体的生活环境
柯赫定律（Koch's postulates）：一套用于证明某种特定微生物引起特定疾病的标准
新陈代谢（metabolism）：细胞内所有的生物化学反应
微生物（microorganism）：一种显微有机体，包括单细胞、多细胞的微小生物和病毒
病原体（pathogen）：致病微生物
纯培养（pure culture）：只有一种微生物的培养物
核糖核酸（RNA）：涉及蛋白质合成的信使 RNA、转运 RNA 和核糖体 RNA
自然发生说（spontaneous generation）：认为活着的生物体起源于非生命物质的假说
无菌（sterile）：无任何生命有机体和病毒

微生物学（microbiology）是研究微生物的科学。微生物（microorganism）是一大群种类各异、独立生活的生物，以单细胞或群体形式存在；通常意义上也包括病毒，然而病毒只是一种显微结构，而不是细胞结构。

微生物学的研究内容是什么？这里列举了几个研究方向。①研究活细胞及其生命活动。②研究能独立生存的微生物，尤其是细菌。细菌是一大群结构简单的细胞，具有重要的基础研究和应用价值。③研究微生物的多样性和进化及不同种类微生物产生的方式和原因。④研究微生物在人类社会以及动植物体中的作用。微生物还可以通过另外的一种或者多种方式影响地球上的其他生命（图 1.1），因此，对微生物的研究具有非常重要的意义。

动、植物细胞不能在自然界中独立生存，只能作为多细胞生物的一部分存在。而单独的微生物细胞就能实现生命过程，如生长、能量代谢和繁殖。

在本章开始的微生物世界之旅中，我们将了解什么是微生物及它们对生命的影响，这为下一章解释微生物的结构和进化搭建了舞台。此外，还会将微生物学作为一个科学发现的过程放在历史的层面上加以介绍。在此，我们要感谢早期的微生物学家和目前仍从事微生物研究的科学家，是他们使我们能接触到医学微生物学、农业微生物学和环境微生物学的各个分支。

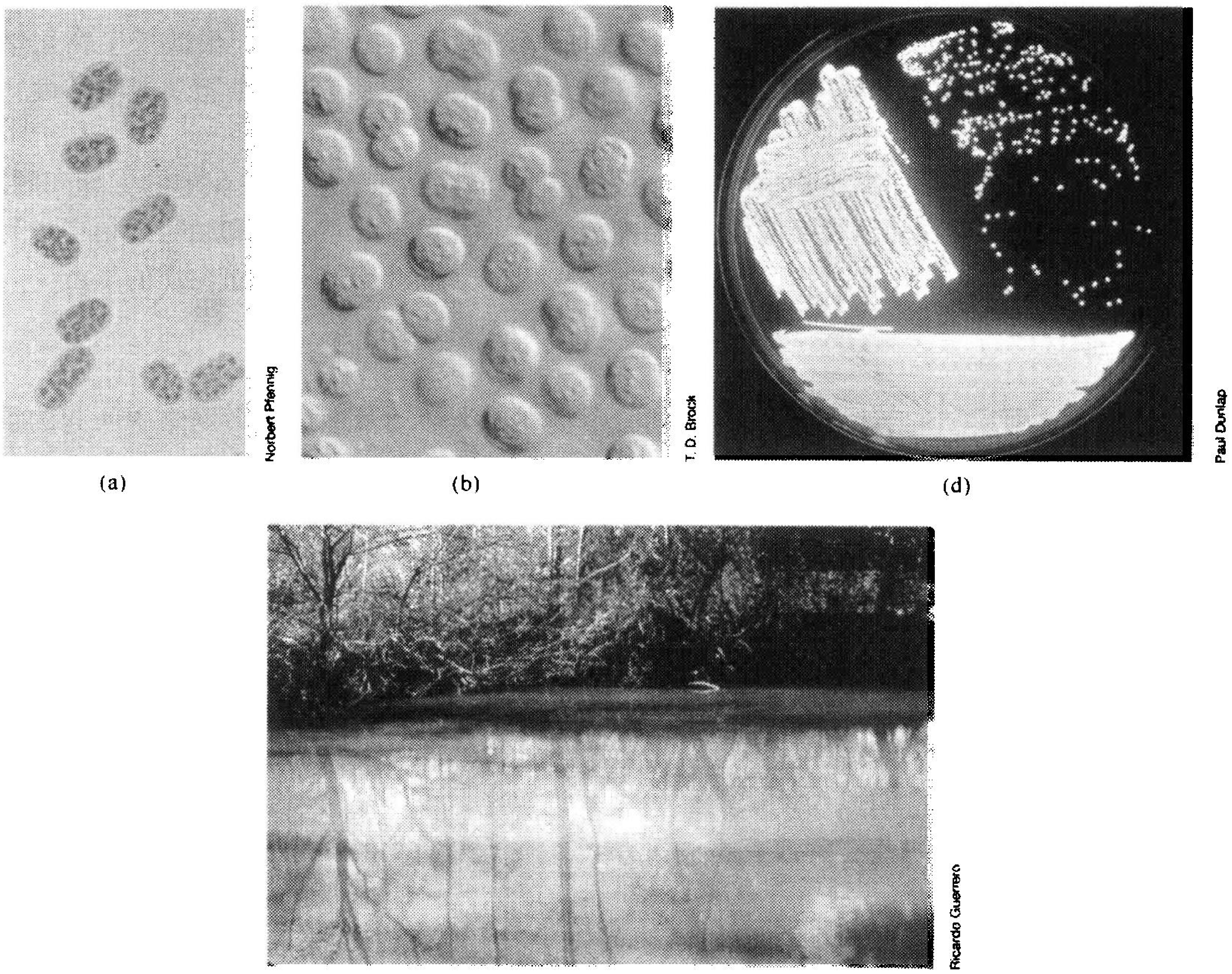


图 1.1　各种各样的微生物。（a，b）单独的微生物细胞可以独立存在。图中（a）为光合微生物紫色细菌（purple bacteria），（b）为蓝细菌（cyanobacteria）的光学显微照片。紫色细菌是地球上最早的光营养微生物，而蓝细菌是地球上最早释放氧气的细菌。蓝细菌使得大气充满了氧，使其他形式的高等生命得以进化。（c，d）自然界或者实验室中细菌可以形成非常大的群体。（c）是西班牙 Ciso 小湖中紫色细菌形成的菌绒（图 1.15），（d）在实验室培养基上生长的发荧光的鲾发光杆菌（*Photobacterium leiognathi*）。1ml 的湖水或者是平板上的单一菌落包含十亿多个单细胞。

Ⅰ 微生物学简介

本章前 4 节将介绍的主题是将微生物以细胞为单位来研究它们在自然界中的生活环境和方式，以及微生物已经和将要对人类产生的影响。

1.1 微生物学

微生物学围绕两个主题展开：①理解生命的基本科学；②人类需要的应用科学。

作为一门基础生物科学，在探索生命过程的本质时，微生物学提供了重要的、可行性的研究工具。通过对微生物的研究，人们阐明了生命活动背后的一些精细的物理和化

学原理，这在很大程度上是由于微生物细胞与多细胞有机体的细胞具有共同的生物化学特性所致。同时由于微生物在培养基中可达到很高的密度（图 1.1d），很适于生物化学与遗传学研究，因此，微生物已成为研究包括人类在内的高等有机体细胞功能时的模式生物。

作为一门应用科学，微生物学可以解决许多重要的医学、农业和工业中的实际问题。一些重要的人类、动物和植物疾病均由微生物引起；微生物在土壤肥力和动物繁衍中也起着重要作用；许多大型工业过程也以微生物学为基础，如抗生素和人类蛋白质的生产。

微生物的重要性

正如本书中展示的那样，我们将看到微生物在人类活动及地球生命网络中所起的重要作用。如果没有微生物，高等有机体无法产生也无法持久存在。事实上，我们呼吸的氧气都源于过去的微生物活动（图 1.1b）。而且我们还会看到人类、植物和动物是如何通过关键营养物的循环利用和有机物的降解而紧密地与微生物联系到一起。在维持和促进生命方面，任何其他的生命形式都不如微生物重要。

在植物和动物出现之前，微生物已经在地球上存在了几十亿年。因此它们的进化多样性已远远超过了高等有机体。巨大的生物多样性可以解释微生物的一些惊人的特性。例如，微生物是如何生活在一些不适合高等有机体生活的环境中的，以及它们多种多样的生理能力是如何使它们成为地球上最伟大的化学家。我们还会看到这些微生物是如何与高等有机体建立起一些有利或有害的关系。人类所享受到的健康及所遭受到的疾病也是由微生物引起。

很明显，微生物在生态圈中起着重要作用。因此，微生物学是所有生命科学的基础。我们将把微生物看作细胞实体来开始对这门重要学科的研究。

1.2 微生物细胞

细胞（cell）是所有生物的基本单位。一个单独的细胞是一个实体。它以细胞膜（或细胞壁）同其他细胞相分隔。细胞中含有大量的化学物质和各种亚细胞结构（图 1.2）。分割是生命的先决条件，这是因为生命物质必须要达到一定的浓度才能引起必要的化学反应。然而，细胞不是封闭的体系，而是一个开放、动态的整体。细胞与外界环境时刻进行信息和物质交换，经常发生变化。第 2、4 和 14 章中将详细地研究细胞的结构与功能。

细胞化学和主要结构

细胞是高度有序的结构，主要包括四种化学物质：蛋白质（protein）、核酸（nucleic acid）、脂类（lipid）和多糖（polysaccharide），它们统称为大分子（macromolecule）。这些大分子在不同细胞中的化学性质和排列的不同使有机体之间互不相同。因此，从化学角度上讲所有细胞无论是植物、动物的一部分还是微生物在很多方面是相同的。

细胞中有一些关键的结构。细胞质膜（cytoplasmic membrane）是细胞内外分割的屏障。细胞膜内有各种不同的结构及悬浮或溶解在细胞质中的化学物质。细胞质中存在

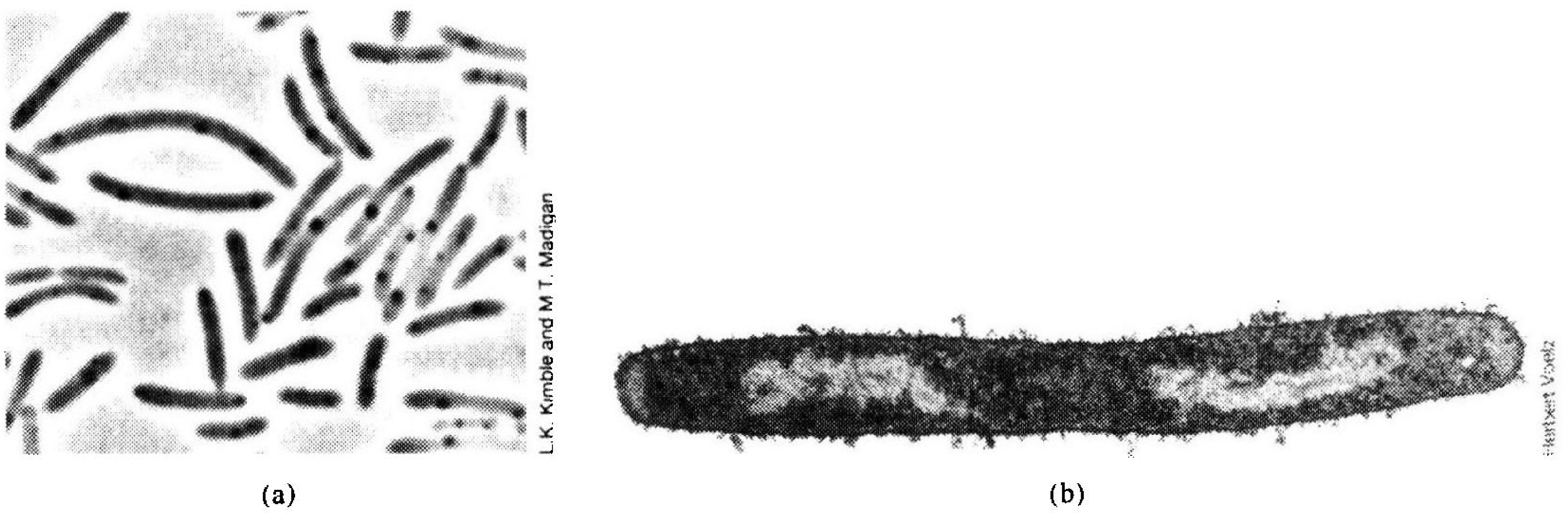


图 1.2　细胞。(a) 光学显微镜下看到的杆状细菌的显微照片，单细胞的直径约为 1μm。(b) 电镜下的细菌细胞的纵切面。两个较明亮的区域为拟核，是细胞中 DNA 聚集的区域。

着细胞生长和执行功能所需的结构。关键的结构是细胞核 (nucleus) 或者拟核 (nucleoid)，是遗传信息脱氧核糖核酸 (DNA) 储存的地方；除此之外还有核糖体 (ribosome)，是蛋白质合成的场所。

生命系统的特点

什么是生命的重要特征？细胞和无生命的物体有什么区别？对活着的概念的理解局限于我们能在地球上看到什么，或者可以从化石记录中推断出什么。但根据现在掌握的生物学知识，我们可以发现生命系统中的一些共同之处。将它们在图 1.3 中总结出来。

所有具有细胞结构的有机体都表现出某种形式的代谢 (metabolism)，即细胞从外界环境中吸收营养并进行转化——以细胞能利用的形式储存能量，并将产生的废物排泄出去。所有细胞都进行繁殖 (reproduction)，即一个细胞可以引导一系列生物化学反应的发生从而导致细胞的生长和分裂并形成两个细胞。很多细胞能够分化 (differentiation)，这是一个新物质和结构形成的过程。分化经常是细胞生命循环中的一部分，在分化过程中能产生一些新的特殊结构，如孢子，它的形成与繁殖、散播及生存相关。

细胞可以对环境中的其他细胞产生的化学信号产生反应。因此，细胞能够进行交流 (communication)，它甚至能通过散布在细胞间的小分子物质感知细胞的数量，这个过程叫做密度感应 (quorum sensing)。尽管不是很普遍，但是生物体通常能进行自我推动的运动 (movement)。我们会在微生物界发现一些不同的运动机制。通过进化 (evolution)，细胞可以交换各自的特性并将新的特性传递到下一代。

作为机器和编码装置的细胞

可以从两个方面看细胞。一方面，将它看作是一种进行化学转化的机器。化学机器中的催化剂是酶 (enzyme)，是一种可以加速化学反应的蛋白质 (图 1.4)。另一方面，可将它看作是和计算机类似的编码装置 (coding device)，它能储存和处理遗传信息 (DNA)，并在繁殖过程中将遗传信息传递到下一代 (图 1.4)。遗传信息的储存和处理将在第 7 章中讨论，本章将涉及细胞的主要功能，DNA 复制 (replication)、转录 (transcription) 产生 RNA 并翻译 (translation) 成蛋白质。

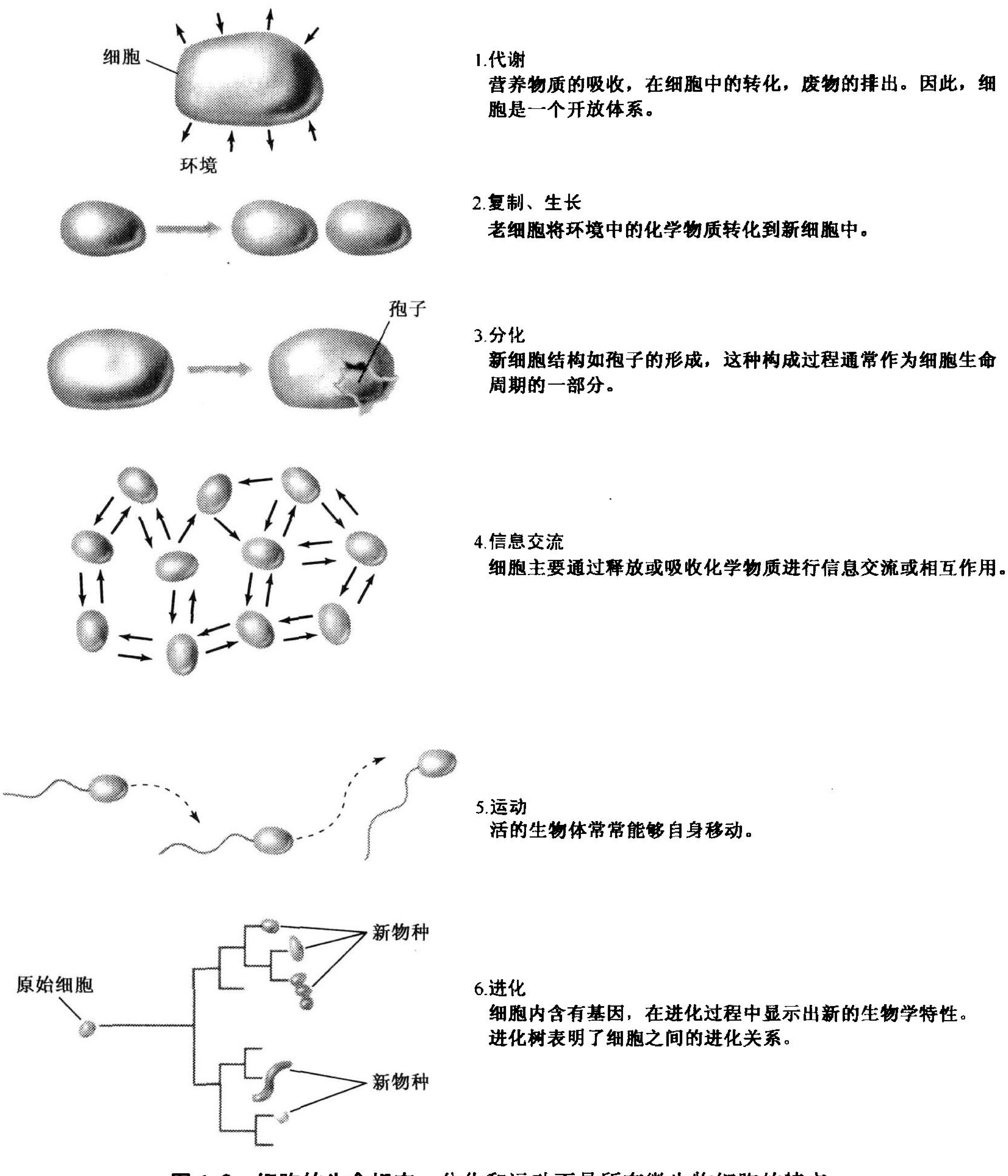


图 1.3　细胞的生命标志。分化和运动不是所有微生物细胞的特点。

实际上，细胞既是化学机器又是编码装置。细胞的生长将这两种特性联系起来。在合适的条件下，一个细胞长大后分裂成两个细胞（图 1.4）。如果严格按照这个有序过程进行，细胞中的所有成分必须加倍（double）。这就要求细胞的化学机器能够提供能量和合成大分子的前体物，并且在细胞分裂时所产生的两个细胞必须含有形成更多细胞所需的所有遗传信息。因此，在生长过程中必须有一个 DNA 复制的过程（图 1.4）。细胞的化学机器和编码装置功能必须高度协调才能使细胞准确复制。实际上，以后我们会看到，除去协调之外，细胞的各种化学机器和编码装置还会受到调节（regulation），这

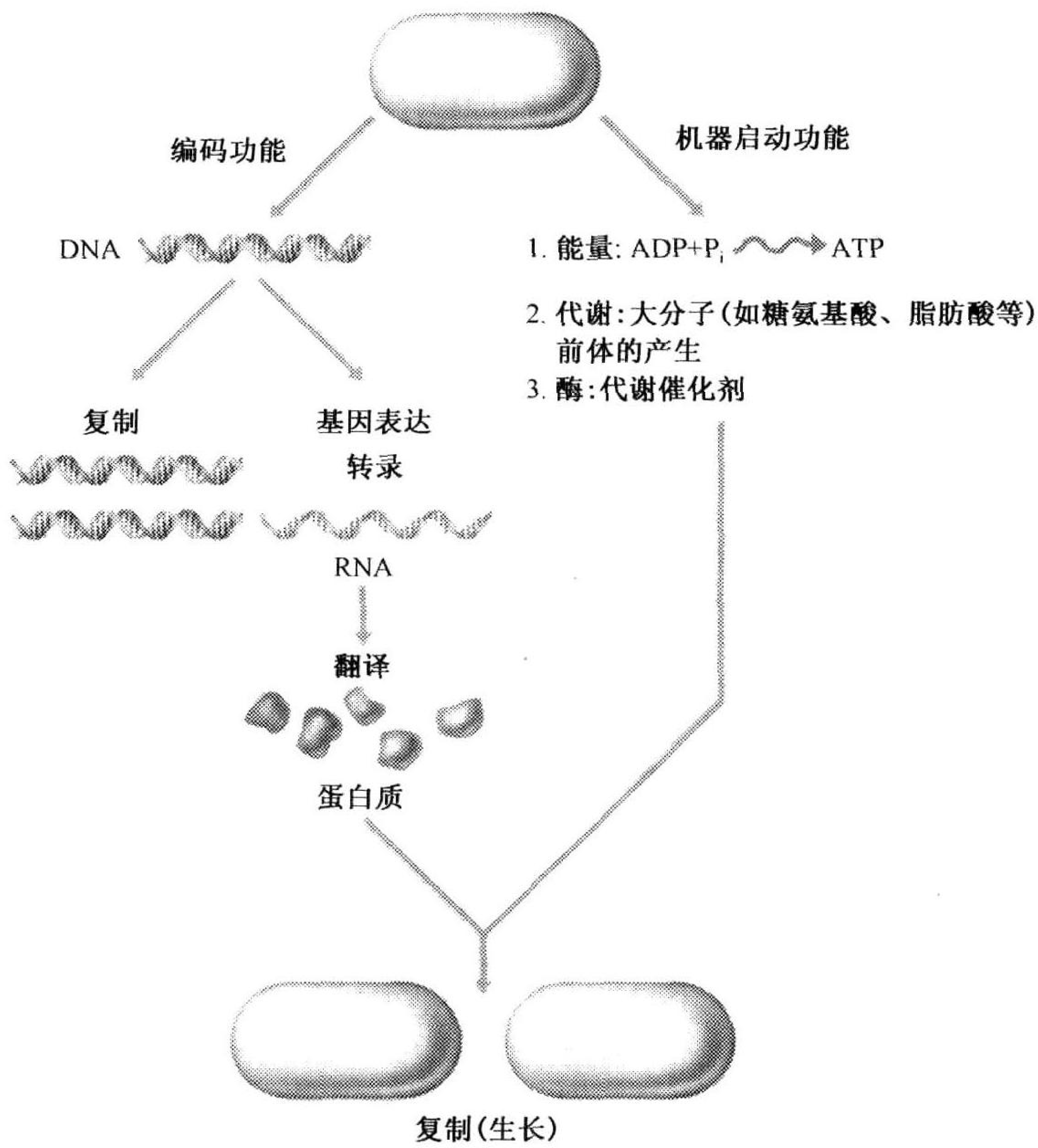


图 1.4　细胞的机器和编码功能。细胞要进行自我复制就必须①提供足够的能量和前体物以合成新的大分子物质；②遗传装置必须进行复制以便在细胞分裂时每个细胞都能接收到一个拷贝的遗传物质；③基因表达（转录和翻译过程）合成适量的蛋白质和其他大分子物质来形成新细胞。

种调节能确保细胞与外界环境之间的协调一致。

第一个细胞

第一个细胞从何而来？由于所有细胞都具有相同的结构，人们推测它们都来自于一个祖先：所有生命的共同祖先（universal ancestor）（第 11 章）。第一个细胞一定是一种非细胞结构，通过某种方式来源于一种前细胞（procellular）结构。地球上第一个细胞大约出现在 38 亿年前——之前可能经历了几百万年的形成过程。然而，一旦第一个细胞产生，它们就不断生长和分裂形成群体。进化过程将会对这些早期的生命形式进行改进和分化。经过几十亿年的进化，出现了大量的细胞形态。本书将在第 2 章中初步介绍微生物的多样性，然后在第 12～16 章中加以详细讨论。

概念检查

细胞膜是细胞内外的屏障。其他特征包括细胞核或者拟核和细胞质。代谢和复制与生命状态相关。可以将细胞看作是化学机器和编码装置。生命在地球上已经存在了近

40 亿年。

- 列出 4 种细胞大分子。
- 列出 6 种与生命有机体相关的特性。为什么每种特性对于细胞的存活都非常重要?
- 比较微生物细胞的化学机器和编码装置的功能。为什么对于细胞而言二者缺一不可?

1.3 微生物及其自然环境

自然界中，细胞与其他细胞密切联系形成的集体叫做种群（population）。种群是由同一细胞经过连续分裂而形成的一群细胞构成。微生物种群的生活环境叫做生境（habitat）。在微生物生境中，一个种群的细胞很少单独生长而是与微生物群落（microbial communities）互相作用（图 1.5）。群落成分和细胞数量由生境的资源和条件决定。对微生物在天然生境中的研究叫做微生物生态学（microbial ecology）。

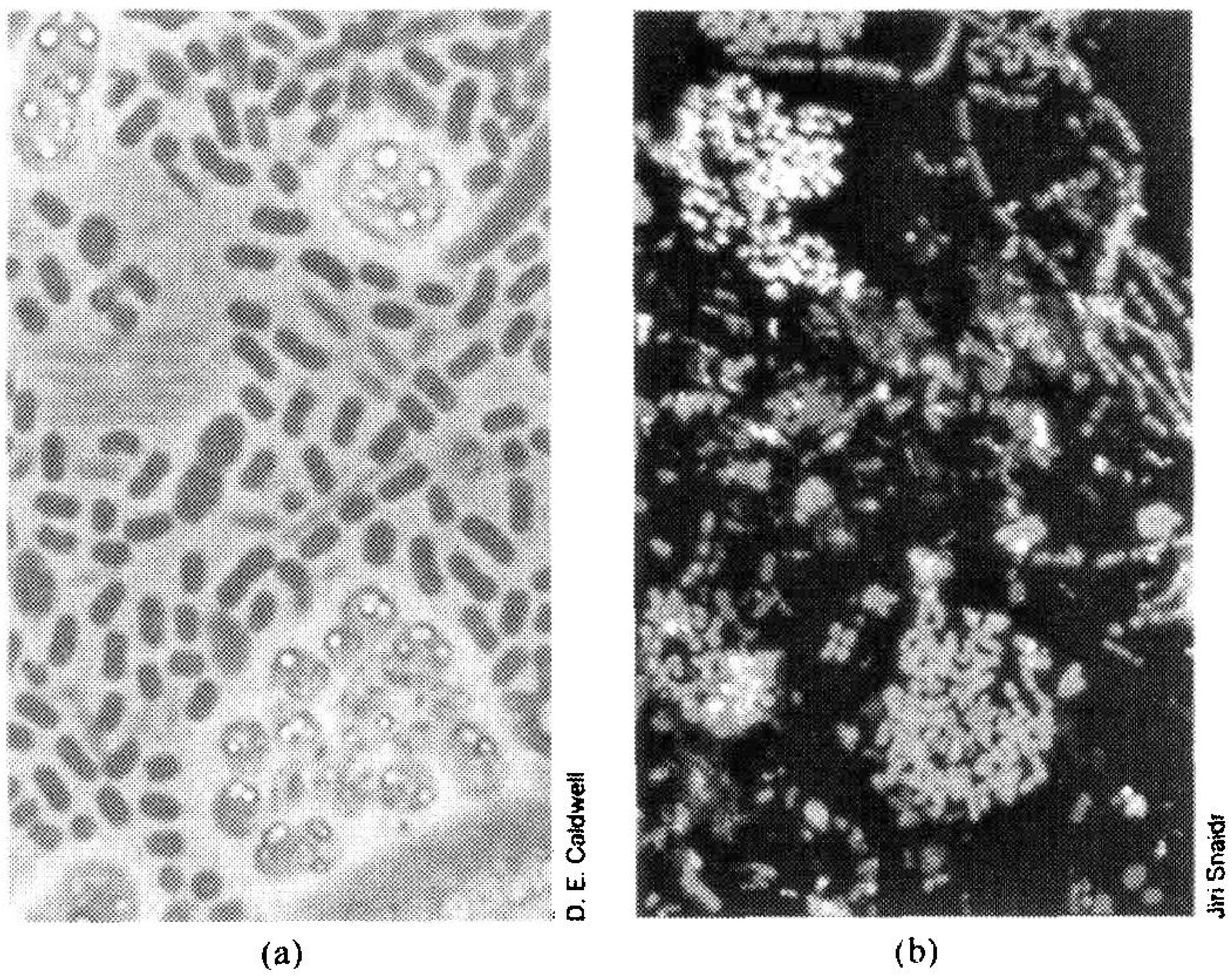


图 1.5 微生物群落的一些例子。(a) 在密歇根小湖深处形成的细菌群落的显微照片，里面有各种不同大小的细胞。(b) 下水道淤泥中形成的细菌群落。采用不同染料对样品进行染色，每种染色方法都能染出不同的细菌类群（18.4 节中的图 18.11b 说明了详细的染色过程)。引自 Amann R, Snaidr J, Wagner M, Ludwing W, Schleifer K H, 1996. *Journal of Bacteriology* 178: 3496～3500. Fig. 2b© American Society for Microbiology。

有机体之间的相互影响及它们对生境的影响

微生物群落中不同种群之间相互作用对种群有利也有害。很多情况下，种群之间相互作用又互相协调。例如，某些细胞的一些无用的代谢产物对于其他微生物是营养物质。生境中的有机体还和外界的物理和化学环境相互作用。生境的特点各不相同，对一种微生物适合的生境对其他微生物可能有害。总的来讲，我们把生命有机体和它们的物

理和化学环境称作生态系统（ecosystem）。主要的微生物生态系统包括水生（海洋、池塘、湖泊、小溪、冰川、热泉）和陆地（土壤、深层地面）微生物及包括植物和动物在内的高等有机体。

生态系统在一定程度上也受到微生物活动的控制。进行代谢的有机体从环境中吸收营养构建新的细胞。与此同时，也向环境中排放一些废物。因此随着时间的推移，微生物生态的物理和化学性质也会通过营养物质的循环发生变化。环境变化可能使得其他微生物得以生存。例如，氧气对于某些微生物而言是非常重要的营养，但对另一些微生物而言是有害的。然而一些好氧菌的耗氧活动可能使得生境变为无氧，这种无氧环境对于那些厌氧菌而言是很适合的。

了解了微生物结构和功能、遗传进化和多样性的一些特征之后，下面几章中将讨论微生物是如何影响动物、植物和整个全球生态系统。

微生物生命的界限

微生物个体虽小，但在地球上它们的生物量即使与高等有机体相比也是非常巨大的。对土壤或者水等天然物质进行研究时都会发现微生物。尽管这些微生物小得看起来微不足道，但是单个细胞能无限繁殖形成大的种群而对生境产生影响（图 1.1c）。因此微生物非常重要，它们是每一个生态系统中的重要组成部分。

对地球上微生物的总数目，特别是原核生物进行的估计表明，其数量级在 5×10^{30}。这些微生物中存在的碳相当于地球上所有植物的碳（植物中的碳源含量远远超过动物中的）。除此之外，原核微生物中的总氮源和磷源是所有植物的 10 倍。

因此，尽管原核细胞很小，却构成了地球上生物量的主要部分，它们是主要的营养物质储藏器。另外一个令人吃惊的事实是，大多数的原核细胞都聚居在海平面和陆地表面之下。由于这些栖息地很少被发掘，因此还有很多未知的微生物需要微生物学家去发现和研究。

概念检查

微生物在自然界中以种群的形式存在，不同的种群在群落中相互作用。微生物种群的活动能极大地影响栖息地的物理和化学特性。微生物占据着地球上巨大的生物量。

◆ 什么是微生物生境？

◆ 微生物如何改变其生境的物理和化学特性？

◆ 地球上大多数的原核生物在哪里？

1.4 微生物对人类的影响

微生物学家的研究目标就是通过对微生物活动方式的认识，人为地采取一些措施来增加微生物的益处，减少其危害。人们在这方面已获得了巨大的成功，可以看到，微生物学在提高人类健康水平和造福人类方面起着重要作用（图 1.6）。

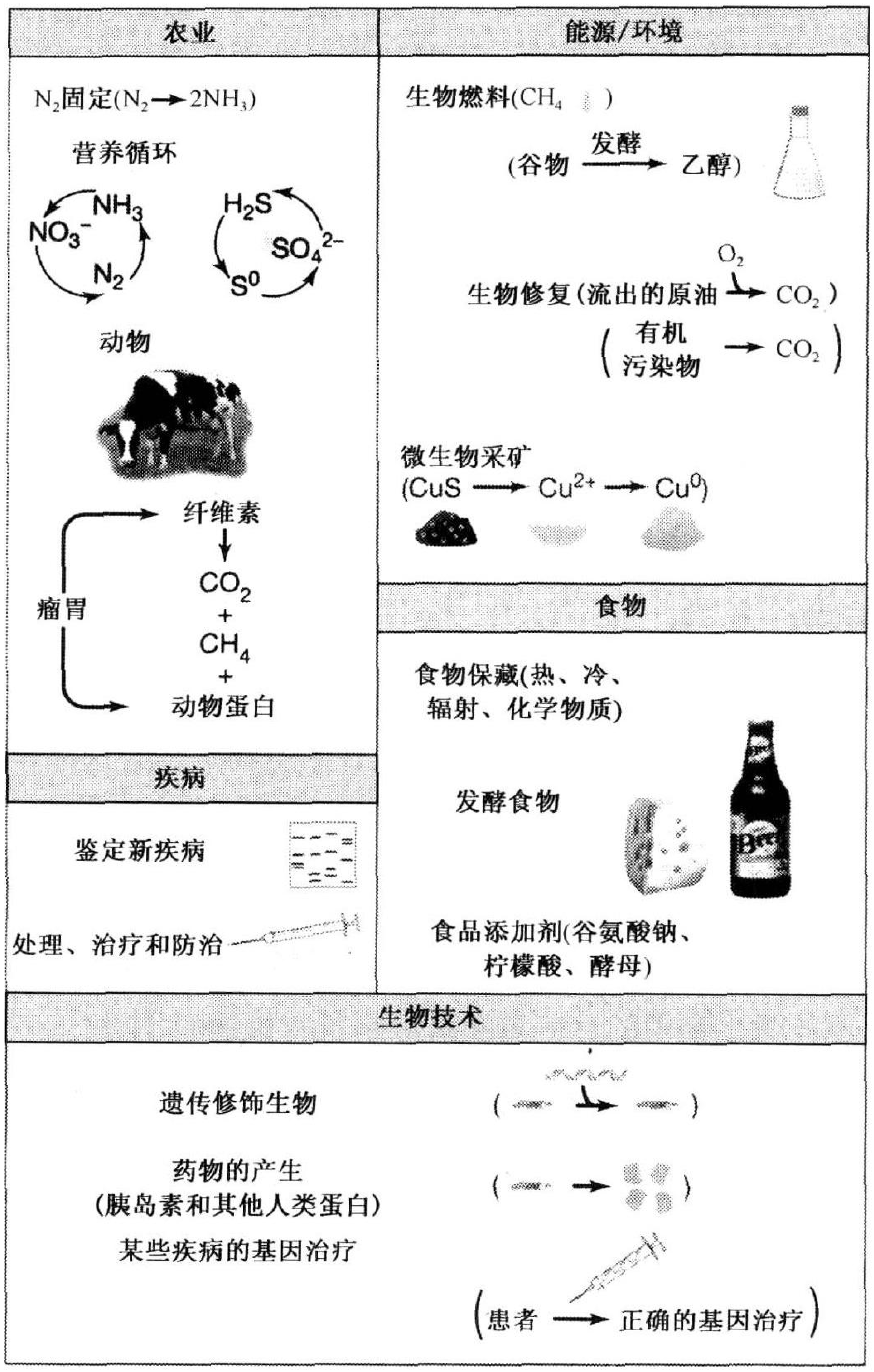


图 1.6 微生物对人类的影响。尽管很多人认为微生物是疾病的根源，但实际上只有很少的微生物能引起疾病。微生物除了作为病原外，还对我们生活的诸多方面有影响。

作为病原的微生物

图 1.7 对微生物学家控制疾病的成功案例进行了统计。该图将现在的致死因素与 100 年以前的数据进行了比较。20 世纪初，主要的死亡因素是由病原菌（pathogen）引起的传染病（图 1.7）。儿童和老年人容易受到微生物疾病的侵扰。今天，传染病已经不是发达国家主要的致死因素。对传染病的控制是我们对疾病的发生过程有了全面了解，也是卫生条件的改善和新抗生素使用的综合结果。正如本章后面部分所讲述的那样，作为一门科学，微生物学在研究传染病方面有自己的基础。

尽管目前我们生活的世界中，许多病原微生物都已经得到控制，但是对获得性免疫

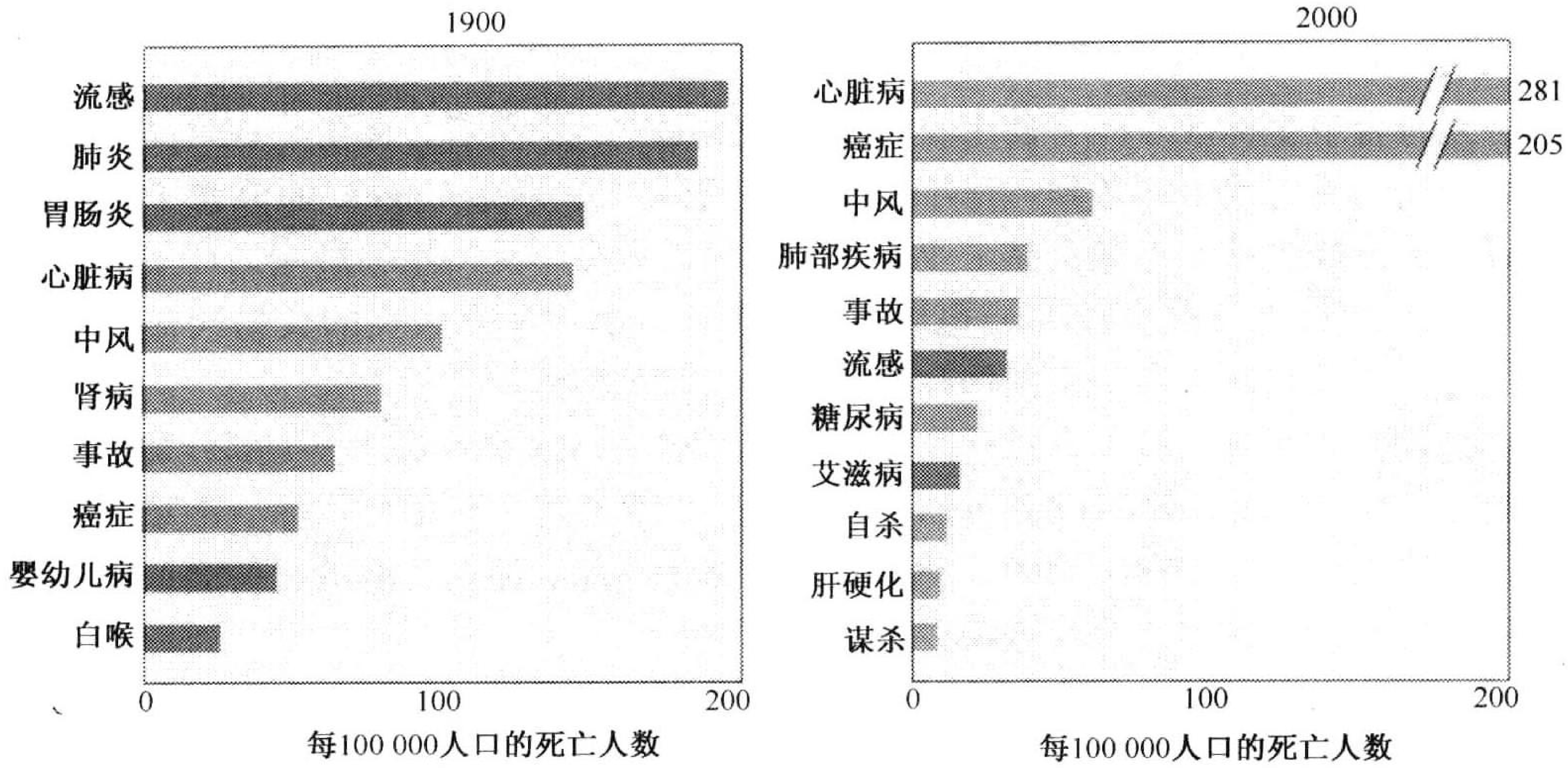


图 1.7 美国 1900 年和 2000 年的 10 种主要的致死疾病。1900 年传染病是主要的致死因素，而今天它已经不太重要。微生物疾病用红色表示，非微生物疾病用绿色表示。数据引自美国国家健康统计中心。

缺陷综合征（AIDS）的缓慢死亡个体、对抗癌药物处理而导致免疫系统破坏的癌症患者，以及对多种药物抗性病源感染的个体来说，微生物对人类仍构成主要威胁。虽然，在世界范围内根除天花是医学的重大成就，但是，每年还是有成百万的人被疟疾、结核、霍乱、嗜睡和严重腹泻等传染性疾病夺去生命。

很明显，目前微生物仍在严重威胁人类的生存。但另一方面，我们必须强调，大多数微生物对人是无害的。事实上，大多微生物不但一点害处也没有，它们对人类社会还具有巨大的价值。在保健工业中，微生物甚至起着有益的作用。现在我们就来了解一下这些过程。

微生物和农业

整个农业系统在许多重要方面都依靠微生物的活动（图 1.6）。许多主要的农作物属于豆科植物，它们的生长同专一性细菌紧密相连，这些细菌可在植物的根部形成根瘤（nodule）结构。在根瘤中，大气中的氮（N_2）转变成植物可用于生长的氮化合物。根瘤细菌的固氮活动，减少了对昂贵肥料的需要。

微生物在农业上的另一个重要性在于，某些动物是反刍动物，如在牛和羊的反刍消化过程中微生物是必需的。这些主要的农业动物具有专一性消化性器官——瘤胃（rumen），微生物在瘤胃内进行消化。实际上，没有这些微生物，牛和羊的饲养是不可能的。

在植物营养方面，微生物在碳（carbon）、氮（nitrogen）、硫（sulfur）这些重要营养成分的循环中起着关键作用。土壤和水中的微生物可将这些元素转化成植物容易利用的形式。微生物对农业既有益处，也有害处。由微生物引起的动物和植物疾病具有重要的经济影响。如 2003 年暴发的疯牛病迫使美国关闭了几个重要的外国市场（见 29.10 节），对美国的养牛业产生了短暂却深刻的影响。

微生物与食品

必须符合卫生标准才能将食用农作物和动物提供给消费者。微生物在食品工业中起着重要作用。首先我们注意到，每年由于食品腐败（food spoilage）而浪费了大量的资金。罐头、冷冻食品和干燥食品工业就是为了保证食品不受微生物影响而产生的。食物传播的疾病（foodborne disease）也应当受到关注。因为适合人类的食物同样也能被许多微生物利用，因此必须正确制作和检验食物以避免疾病的传播。

但是，并非所有的微生物对食品都有不利影响。奶制品的制造至少部分是借助于微生物活动，包括乳酪、酸乳酪和黄油，都是主要的具有经济价值的产品。泡菜、腌制食品和一些腊肠也归功于微生物的活动。而且烘焙食品的制造及乙醇饮料的制造也是基于酵母的发酵活动。很多相关内容将在第 30 章介绍。

微生物、能源和环境

微生物在能源生产方面起着重要作用。天然气（methane）是细菌作用的产物，由甲烷细菌代谢产生。光营养的微生物能够收集太阳能生产生命有机体中的储存能量——生物量（biomass）。废物如生活垃圾、剩余谷物、动物废料可以通过微生物转化为生物燃料，如甲醇和乙醇。

还可以利用微生物清理被人类活动污染的大气，这个过程叫做生物整治（bioremediation）（图 1.6）。可以利用各种微生物降解油污、溶剂、杀虫剂和其他环境污染物。地球上多种多样的微生物含有大量的遗传资源，可以利用这些资源来净化环境，很多这些方面的工作正在进行中。

微生物与未来

生物技术最典型的例子是利用遗传修饰的微生物合成具有很高商业价值的专一性产品（第 31 章）。生物技术在很大程度上取决于遗传工程（genetic engineering），即有关基因的人工操作和它们的产品（图 1.6）。用微生物和酶作为分子工具可以对各种来源的基因进行操作和修饰。例如，人胰岛素在糖尿病患者体内含量异常低。目前，通过基因操纵技术，已经能在微生物中生产出人类胰岛素。现在，利用基因组学方法搜索到几百个目的蛋白的基因蓝图，然后将它们转入到合适的受体中用于生产重要的、具有商业价值的蛋白质。

在人类社会，微生物的影响是显而易见的。有太多的理由让我们认识微生物和它们的活动（图 1.6）。著名的法国科学家、微生物学的奠基人之一，巴斯德是这样形容微生物的：“在自然界中，它无限小，但作用无限大。”因此，在我们开始详细研究微生物学前，让我们先简要了解巴斯德和其他科学家对微生物学科的建立所做出的贡献。

概念检查

微生物对人类既有利也有害。尽管我们刻意强调那些有害的微生物（病原菌），实际上自然界中许多的微生物对人类而言益处大于害处。

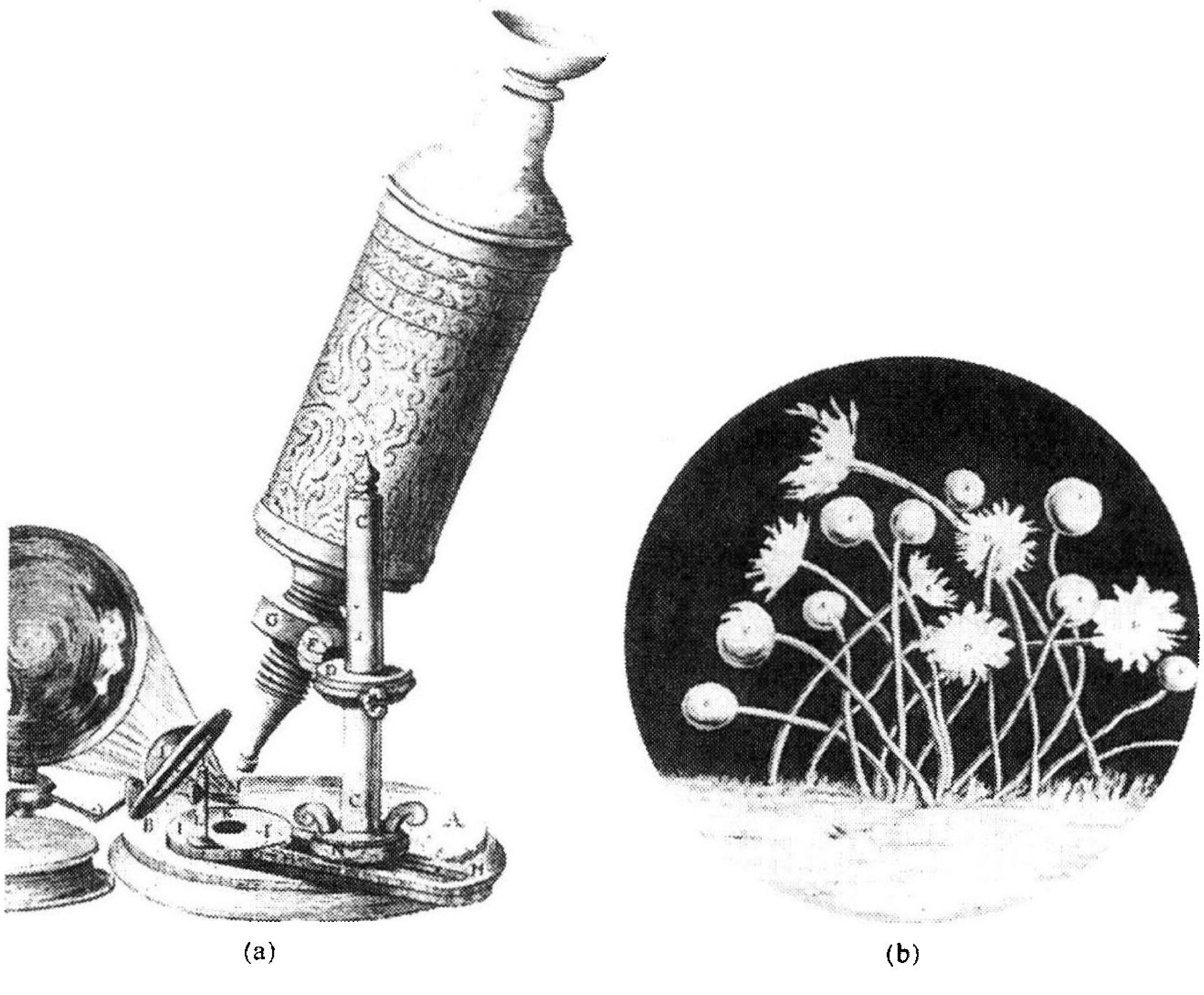
◆ 微生物是如何在食品和农业中起到非常重要的作用的?
◆ 用微生物可以生产哪些燃料?
◆ 什么是生物技术，它将会如何提高人类的生活质量?

Ⅱ 微生物学简史

与其他学科一样，现代微生物学的发展应归功于它过去的成果。尽管微生物学有很深的根基，但直到 19 世纪后微生物学才得到真正发展。从那以后，这一领域就迅速发展并且产生了一些新的相关领域。现在我们就来回顾这一发展历程。

1.5 微生物学的奠基人：胡克、列文虎克和科恩

尽管这些小得不能用肉眼观察到的微生物的确存在，而且人们对此早就有所推测，但发现它们却是同显微镜的发明紧密联系在一起。1665 年，罗伯特·胡克（Robert Hooke）描述了霉菌（真核细胞）的子实体结构（图 1.8），因此他是第一个描述微生物的人。看见细菌的第一个人是荷兰的布商，同时又是显微镜制造爱好者列文虎克（Antoni Von Leeuwenhoek）。1684 年他使用自制的简单显微镜对各种天然来源的物质



(a)　　(b)

图 1.8　早期的显微镜。(a) 罗伯特·胡克在 1664 年所用的显微镜的草图。物镜固定在一个可调的风箱（G）末端。通过单个透镜聚光照明（1)。(b) 罗伯特·胡克画的草图。1655 年这个图发表在 *Micrographia* 杂志上，是第一次对微生物的描述。所描述的有机体是一种生长在皮革表面上的淡蓝色霉菌。圆形的结构（孢子囊）含有霉菌孢子。

进行观察，研究这些物质中的微生物（图 1.9）。

尽管列文虎克的显微镜同当今的显微镜比起来非常粗糙，但通过细心的操作和调节焦距，还是能够看见小到细菌之类的生物。1676 年他在研究辣椒水渗出的过程中发现了细菌。他在给伦敦皇家学会的许多信里，报道了自己的观察结果，并译成了英文发表。列文虎克的“微小动物”一文中就有一些描绘细菌的图（图 1.9b）。

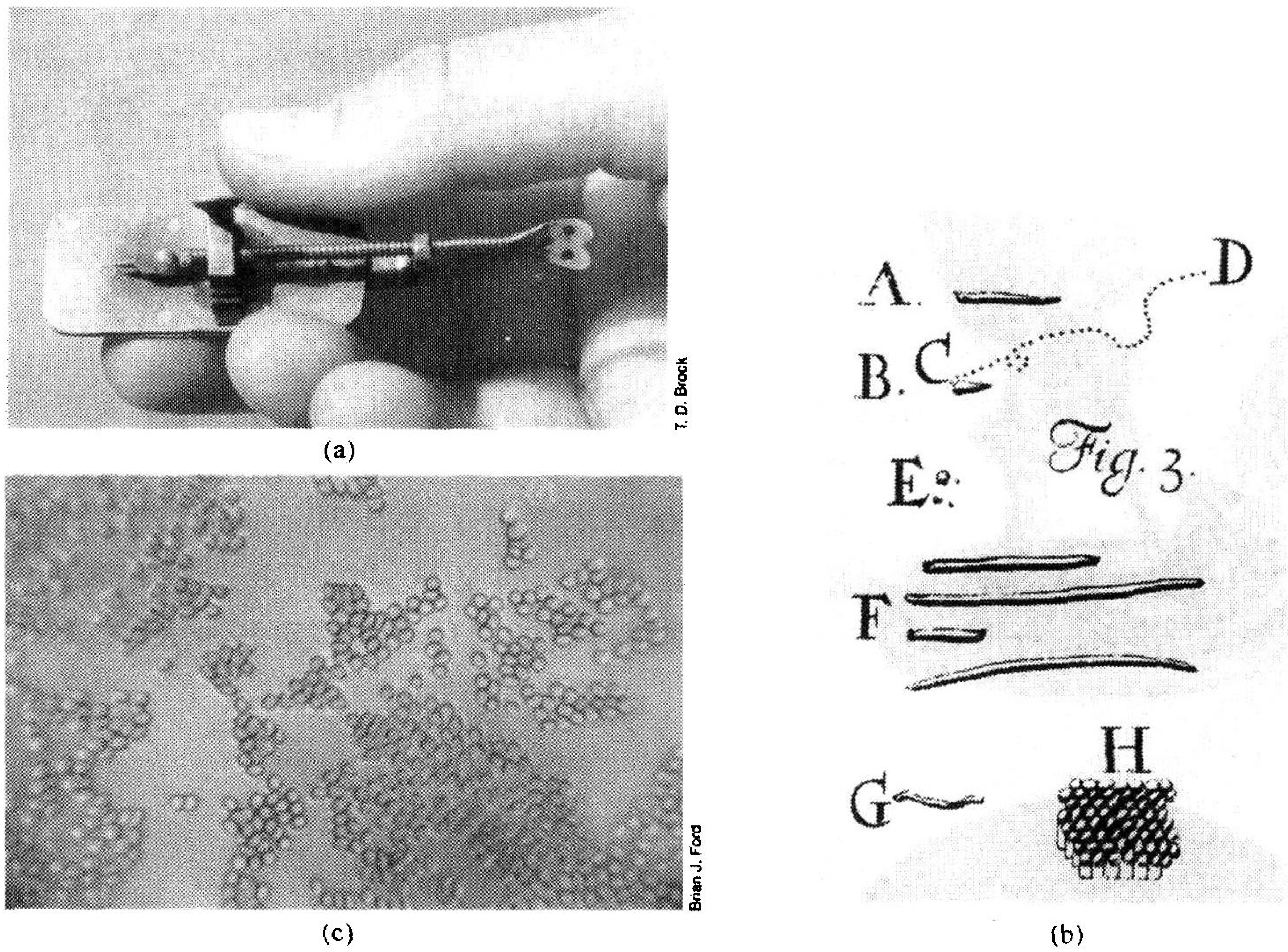


图 1.9 列文虎克的显微镜。（a）列文虎克显微镜复制品的照片。镜片安放在铜片上，旁边是可调节螺旋的尖。（b）1684 年列文虎克发表的细菌图片。即使从这些粗糙的图片中我们也能识别出细菌的一些不同形态。A、C、F 和 G 是杆状。E 是球形或者是圆形。H 是球菌的堆积（见图 4.11）。（c）用列文虎克显微镜拍摄的人类血液图片的显微照片。红细胞非常明显。

随着时间的推移，他的观察为其他人所证实。但是对这些微小生物本质的了解，在接下来的近 150 年中进展很慢。直到 19 世纪，才出现了改良显微镜，并得到广泛使用。在微生物学历史的各个阶段，每一个较大的进步，都伴随着更精密的显微镜的问世，从而使科学工作者能够更深入地研究细胞的秘密。

19 世纪中期到晚期，微生物学得到很大发展，主要因为人们将注意力集中在那个时期生物学和医学普遍关注的两个主要问题上：①生物是自然产生的吗？②传染性疾病的本质是什么？在微生物学发展的初期，有两位伟大的科学家为人们找到了这两个基本问题的答案，他们是法国的化学家巴斯德和德国的物理学家罗伯特·胡克。在我们系统探究这两个人的工作之前，先来介绍一下德国植物学家科恩的研究工作，他与上述两个人是同一时代的人，是细菌学的奠基人。

科恩与细菌学

科恩（Ferdinand Cohn，1828～1898）起初研究植物，但是他对于显微技术天生的爱好使他对单细胞植物——藻类产生了浓厚的兴趣，后来又发展到光合细菌。他认为所有的细菌包括那些缺乏光合色素的种类在内都是植物界的一个成员。他研究显微技术的材料逐步由植物向各种不同的细菌包括大的硫细菌（*Beggiatoa*）转移（图 1.10）。

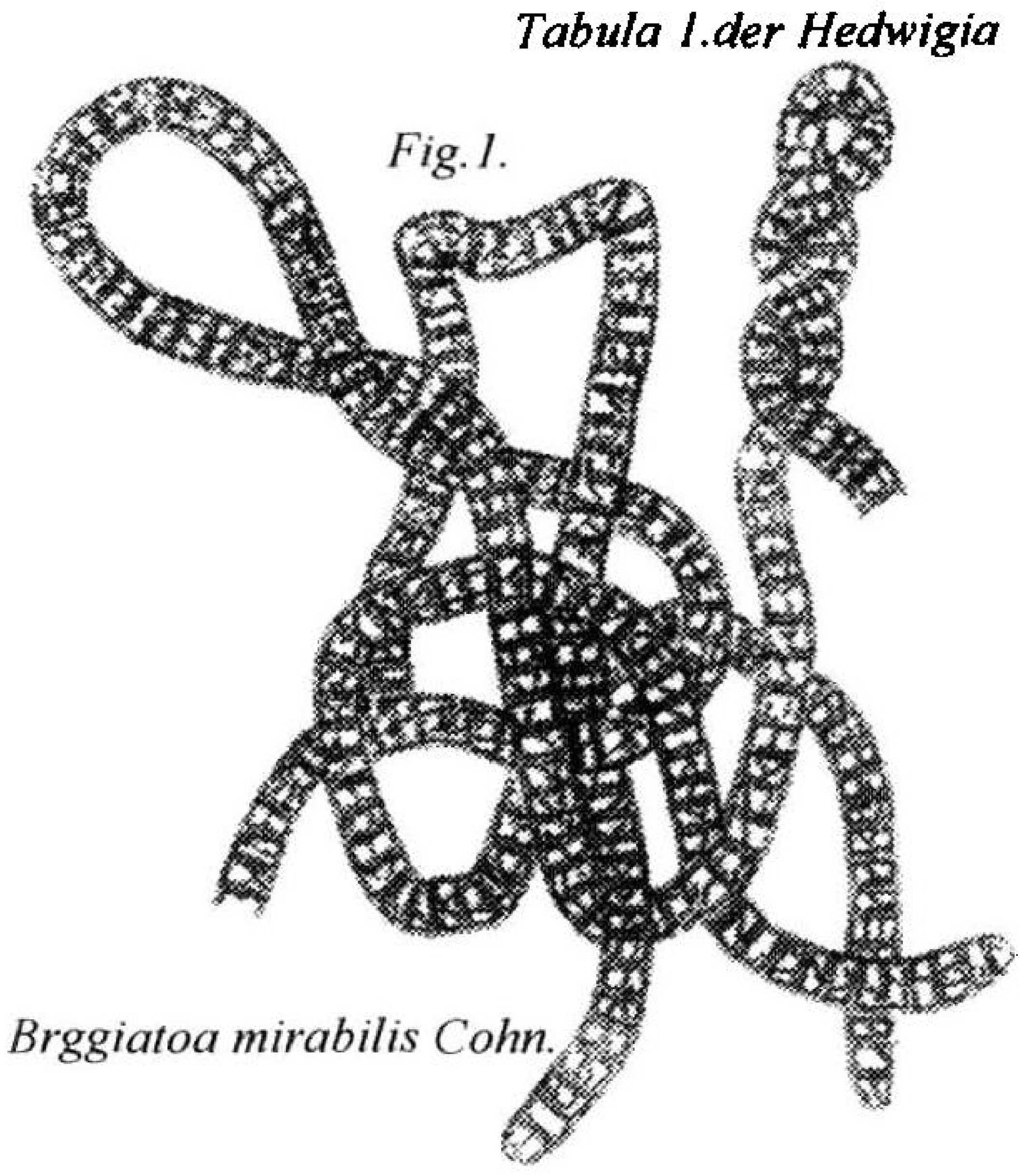


图 1.10　1866 年科恩描绘的奇异贝日阿托氏菌（*Beggiatoa mirabilis*）。细胞中的小颗粒含有硫化氢被氧化的产物元素硫，科恩首次将这些颗粒鉴定为硫颗粒。

科恩对那些能耐热的细菌非常感兴趣，对耐热细菌的研究使他发现了芽孢杆菌属（*Bacillus*）及内生孢子形成的过程。现在我们都知道，细菌的内生孢子是非常耐热的。科恩描述了芽孢杆菌的整个细胞生活周期（营养细胞→内生孢子→营养细胞，见 4.5 节），并发现煮沸只能杀死营养细胞而不能杀死孢子。事实上，他的研究解释了令早期科学家如 John Tyndall 困惑的一种现象，即蒸煮并非是一种可靠的消毒方式。

科恩一直从事细菌方面的研究直到退休。在这一段时间里他为细菌分类学奠定了一些基础，并且创建了一种科学刊物。同时，他还是医学微生物学家罗伯特·柯赫（Robert Koch）的忠实支持者，还设计了简单而有效地防止培养基污染的棉塞方法。柯赫在以后的研究中就使用了这些方法，使他在分离和鉴定一些致病细菌方面取得了很快的进展。

概念检查

胡克首次描述了微生物，列文虎克首次描述了细菌，科恩为细菌学奠定了基础并且发现了细菌的内生孢子。

- ◆ 列文虎克什么时候发现了细菌？科恩什么时候研究内生孢子？
- ◆ 在列文虎克之前是什么因素阻止了微生物学的发展？

1.6 巴斯德、柯赫和纯培养

19 世纪的中晚期，微生物学开始蓬勃发展起来。自然发生说破灭，纯培养微生物学开始走上历史舞台。

巴斯德和自然发生说的否定

圣经时期就存在着自然发生说（spontaneous generation）。它的基本思想是很容易理解的。如果食品放置一些时间，它就会腐败；把腐败的东西进行显微镜检查时，就会

发现许多细菌，有时还有蛆和虫子之类的高等生物。在新鲜食品中是没有细菌的。那么细菌是从哪里来的呢？一些人认为，细菌是从种子或胚芽发展来的，而种子或胚芽是从空气中进入食品的；另一些人认为，细菌是自然发生的。这些问题需要敏锐的观察力才能加以解决。

自然发生说最强有力的反对者是法国化学家路易斯·巴斯德（Louis Pasteur，1822～1895）。巴斯德首先发现空气中存在着大量同腐败物品上相同种类的微生物。因此，巴斯德认为腐败物品上的微生物来自于空气，它们不断地落到物体上，在适宜的条件下就会生长起来。如果这个结论正确，那就意味着，如果把食品进行处理，杀死它们中所有的污染物，食品就不会腐败。

巴斯德用高温消除了污染物，从此，人们认识到了高温加热可以有效地杀死微生

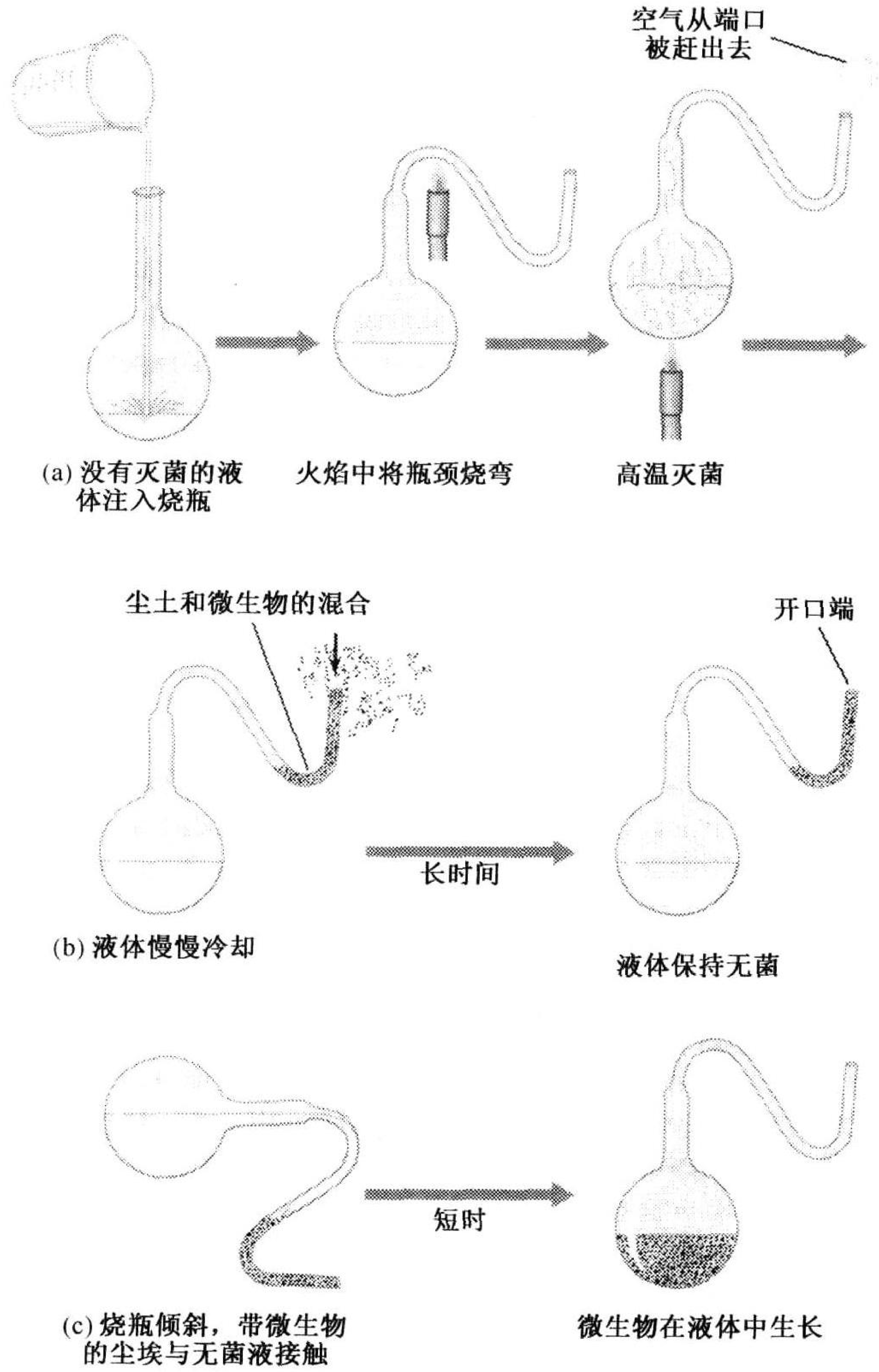


图 1.11 巴斯德的曲颈瓶实验。（a）对瓶子里的物体进行灭菌。（b）如果瓶子保持竖直，没有微生物生长。（c）如果瓶颈的微生物进入到已经灭菌的液体中，微生物就会生长。

物。事实上，很多工作已经证明，如果把营养液密闭在一个玻璃烧瓶中加热煮沸，它就不会腐败。将物体内部或表面上的细菌和其他微生物全部杀死的过程称之为消毒。

但自然发生说的支持者驳斥这种实验，他们断言新鲜空气是自然发生所必需的。密闭在烧瓶中的空气，受到了加热的影响而不能再维持自然发生。巴斯德简单而出色地解决了这一问题。他设计了一个曲颈瓶，现称“巴斯德烧瓶”（图 1.11）。在此烧瓶中可以将腐败的物质加热至沸腾，烧瓶冷却以后，空气可以重新进入，但颈部的弯曲防止了粒状物、细菌或其他微生物的进入。

只要烧瓶颈部不接触灭菌液，烧瓶中被灭菌的物质就不腐败，就没有微生物出现。如果烧瓶倾斜，灭菌液进入烧瓶颈部，腐败就会出现，液体里很快就充满了微生物。这个简单的实验有效地解决了围绕自然发生说产生的争论，使微生物学稳步向前发展。巴斯德的工作也使得一种有效的灭菌过程得以产生，这种方法经过改进后应用到基础科学和应用科学领域。食品科学也受益于巴斯德，因为他的灭菌原理也适用于罐头和许多食品的储藏。

巴斯德在微生物学和医学方面也不断地取得了许多成就。在 1880 年到 1890 年这段非常多产的时期，他的主要成就是获得了多种疾病（如炭疽、飞禽霍乱和狂犬病）的疫苗。这些医学和家禽疾病的突破不仅对巴斯德和柯赫理论具有极为重要的意义，而且还有助于巩固同时期发展起来的疾病细菌理论。该阶段是微生物学历史上的一个重要阶段。

柯赫与疾病的细菌学说和柯赫定律的发展

微生物可以引起疾病的证据为微生物学的发展提供了一个极大的推动力。实际上，在 16 世纪就有人认识到，有些物质可以从患者传至健康人，并引起后者出现前者的疾病。发现微生物后，人们或多或少地认为这些微生物可能引起接触传染病，但又缺乏证据。Ignaz Semmelweis 和 Joseph Lister 发现的卫生设施为微生物在引起人类疾病方面的重要性提供了间接证据，但是一直到柯赫医生进行研究后，才为疾病的细菌学说奠定了坚实基础。

柯赫早期研究牛的一种疾病——炭疽病时发现该病有时也发生在人体上。炭疽病病菌是由一种能形成芽孢的细菌，现称为炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）引起，感染此菌的动物血液中带有许多这种大型细菌细胞（见 25.13 节和图 25.13）。柯赫通过仔细的显微镜观察证实，发病动物的血液里总是存在这种细菌。但是，他明白仅仅用细菌同疾病相伴并不能证明细菌引起了疾病，或许细菌是疾病的结果。

他做了一个有对照的实验，首先从生病动物中取出少量的血注射到另一个动物体内，后者发病死亡。然后，又从第二个动物取血，注射到第三个动物，又得到了特征性的疾病症状。柯赫的进一步实验发现，可以在动物体外营养液中对细菌进行培养，甚至体外培养经多次传代后，再接入动物体内，仍能引起疾病。

根据这些实验和另外一些实验，柯赫提出了下列标准，现称为柯赫定律（Koch's postulates），来验证特殊类型的细菌能引起特有疾病：

1. 这种微生物必须存在于患病动物中，而不存在于健康个体中；
2. 这一微生物可以离开动物体进行纯培养；

3. 将这种培养物接种到敏感动物体后，应当出现特有的疾病症状；

4. 这种微生物可以从实验动物中再分离出来，并且可在实验室中进行再培养，培养出的细菌同原有微生物仍然相同。

图 1.12 中归纳了柯赫定律。它对传染病的研究起了重要的推动作用。它不仅用以证明特殊微生物引起特定疾病，而且由于强调了实验室培养，对微生物学的发展起到了巨大的推动作用。以柯赫定律作为指导，在他之后，研究人员们揭示了许多重要的人类和其他动物疾病的原因。这些发现使防止和治愈传染性疾病得以成功，并奠定了临床医学的基础（图 1.7）。

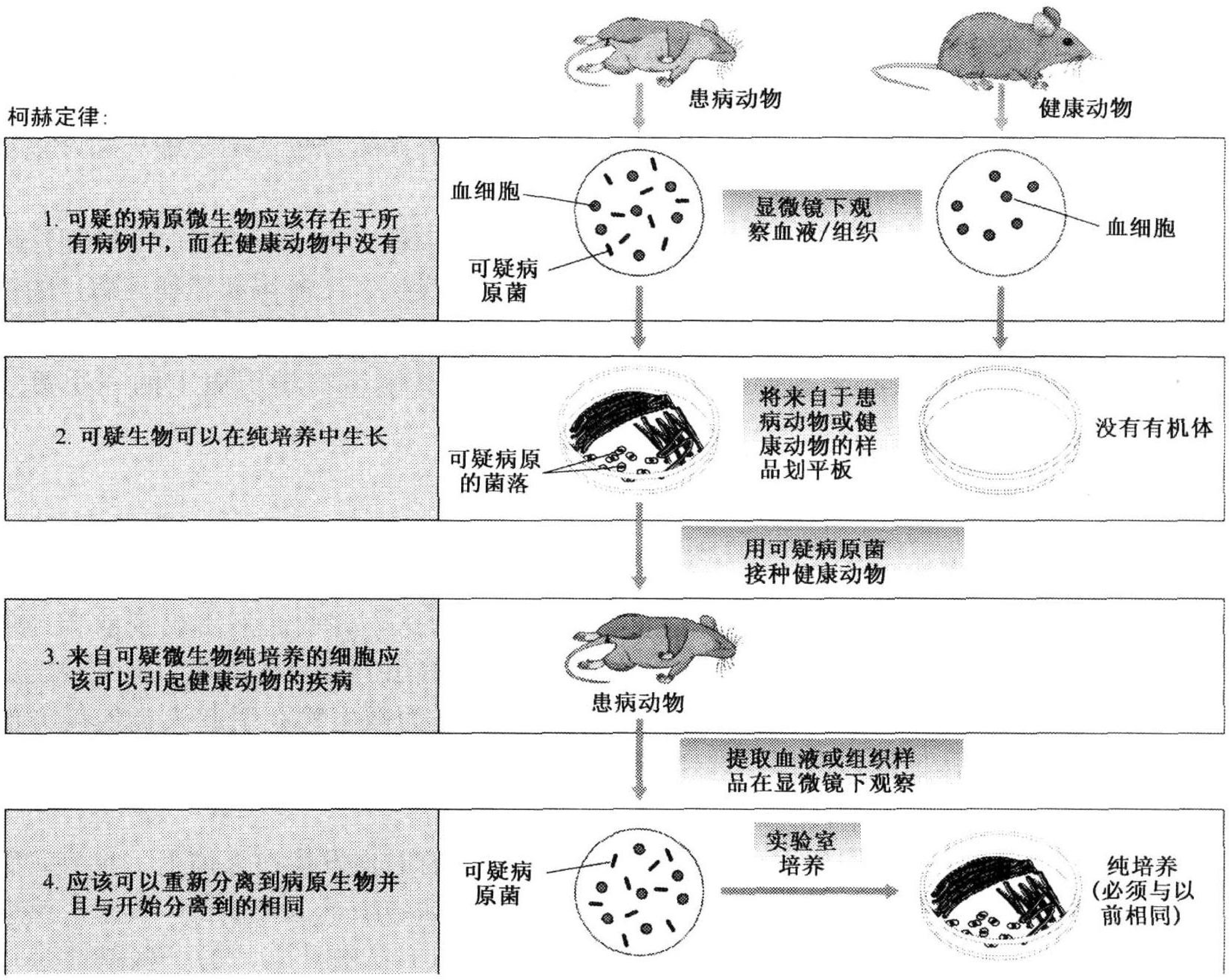


图 1.12 柯赫用于证明特定微生物引起特定疾病的定律。注意：获得可能的病原菌纯培养后要保证实验室培养的微生物能引起疾病，并且还能从致病的动物体内重新获得致病菌。因此确定合适的生长条件非常关键，否则将丢失病原菌。

柯赫与纯培养

为了将特定的微生物与某种特定疾病联系起来，人们必须能从培养物中分离到这种微生物——纯培养。这种观念在柯赫系统阐述定律的过程中从来没有丢失掉（图 1.12），他创造了巧妙的方法从纯培养中获得细菌（见知识窗：固体培养基、培养皿和纯培养）。

起初柯赫采用粗糙的方法，如使用土豆片培养细菌。但他很快就发明了一些更为可靠的方法，这些方法一直沿用至今。柯赫观察到，将固体培养基（如马铃薯片）暴露在空气中加以培养时，就会产生细菌菌落，每一个菌落都有一个特定的形状和颜色。他认为每个菌落来源于一个单细胞，这个单细胞落到表面，找到合适的养料就开始增殖，形成菌落。换句话说，每一个菌落代表一个纯培养。柯赫意识到他的发现提供了一种简单的获得纯培养的方法。但是，并非所有的微生物都能在土豆片上生长，因此柯赫又设计了更多的固体培养基，在这些培养基中，采用了明胶和琼脂作为固化剂（见知识窗）。

对柯赫定律的检验：柯赫与结核病

在医学细菌学方面，柯赫最伟大的成就是发现了结核病的病因。柯赫开始这项研究时（1881年），人类所有死亡报告中1/7是由于结核病引起的（图1.7）。那时，一些有力的证据认为结核是一种传染病。但是，在患病组织或培养液中，从未看到怀疑引起疾病的有机体。柯赫决心去寻找结核病的病原。他使用了前人建立的方法：显微观察、组织染色、纯培养分离和动物模型。

现在人们知道，结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*），即结核杆菌是很难染色的，因为细胞表面存在大量的蜡脂。然而柯赫设计了一种在组织样品中对结核分枝杆菌染色的过程，这一过程中使用了碱性甲基蓝与第二种只能染组织的染料——苯胺棕（见12.23节），今天我们使用的结核分枝杆菌酸固定的Ziehl-Nielsen染色就是在柯赫

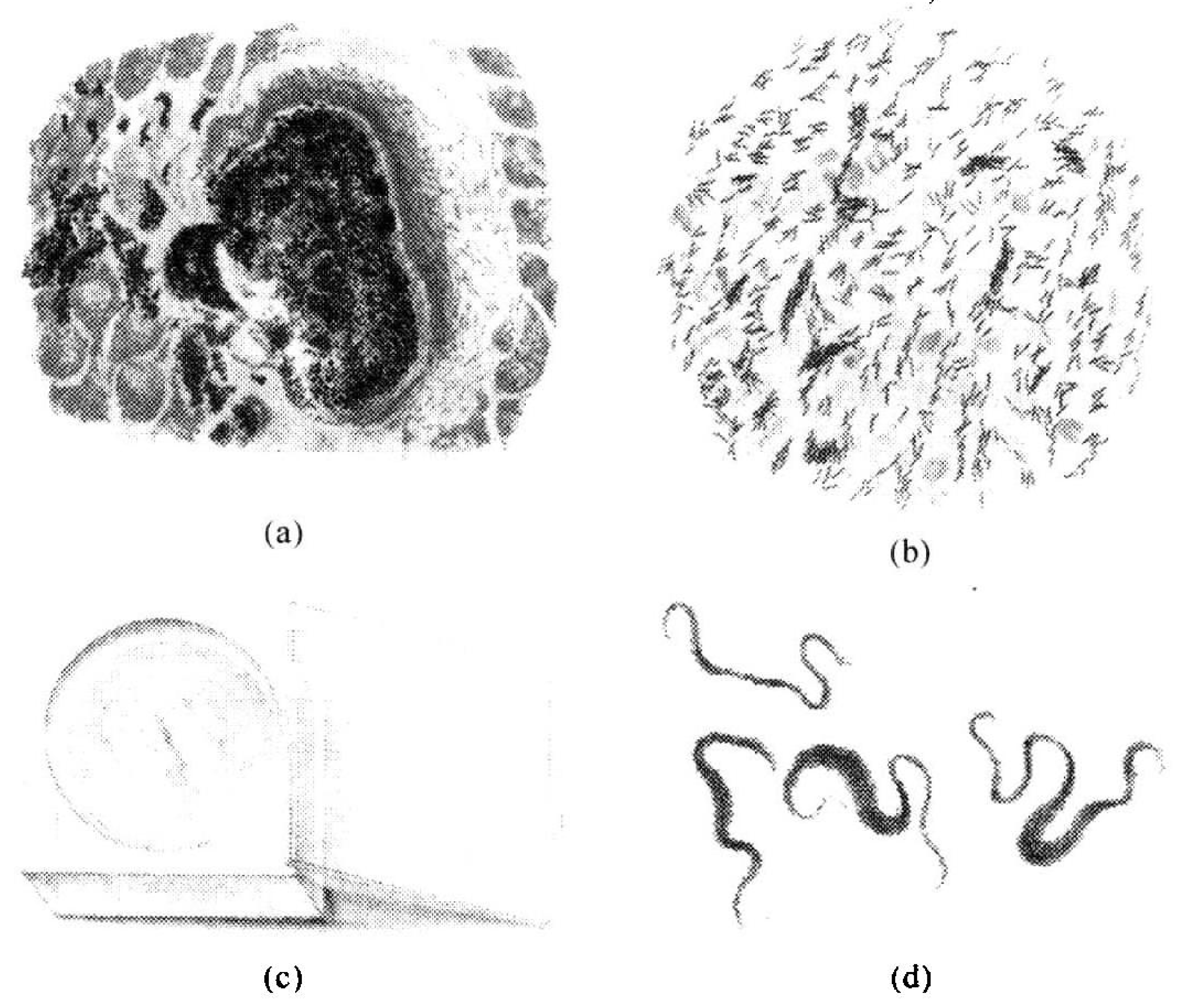


图1.13　在组织和实验室培养中，柯赫描绘的结核分枝杆菌细胞。柯赫首次分离到结核分枝杆菌并且证明它能引起结核病。(a) 来自结核病患者肺组织的切片，分枝结核杆菌染成蓝色，组织染成褐色。(b) 结核病患者痰样品中的结核分枝杆菌细胞。(c，d) 纯培养中结核分枝杆菌的生长。(c) 在凝固血清的玻璃平板上生长。平板置玻璃盒子内（开盖）。(d) 取自 (c) 平皿上结核分枝杆菌的菌落，显微观察，700×。许多细胞聚集，似乎像一条长绳（与图12.70b比较）。这是1884年由柯赫最初描绘的。

方法的基础上发展起来的。柯赫在结核病的组织中观察到了浅蓝、杆状的结核分枝杆菌细胞，其组织被染成浅褐色（图 1.13）。柯赫从他先前有关炭疽病的研究经验中意识到了微生物与结核病之间的关系，但仅这一简单的鉴定是不够的，他必须培养出这种有机体才能证明微生物是引起结核病的唯一原因。

尽管结核分枝杆菌的培养非常困难，但柯赫最终还是成功地在凝固血清上获得了分枝杆菌的菌落。后来他又使用了开始作固化剂的琼脂进行培养（见知识窗）。尽管条件很合适，分枝结核杆菌的生长还是很缓慢，但柯赫的坚持和耐心最终使他获得了来自各种人类和动物的纯培养。

现在证明该菌就是结核病真正病因时就变得相对容易。豚鼠容易被结核分枝杆菌感染，最终死于全身性结核。柯赫证明在患病的豚鼠组织中含有大量的结核分枝杆菌细胞，并且证明从感染动物中获得纯培养，可以将疾病传染给未感染的动物。用这种方法，柯赫成功地论证了定理的四个标准（图 1.12），人们终于认识到结核病的病因。由于柯赫在结核病方面的杰出贡献，1905 年他获得了诺贝尔生理学或医学奖。

概念检查

巴斯德通过对自然发生说的研究提出了控制微生物生长的方法。柯赫制定了研究传染性微生物的标准，并且建立了第一个获得微生物纯培养的方法。

- 巴斯德的实验是如何击败自然发生说的?
- 柯赫定理如何证明疾病的因果关系?
- 固体培养为微生物培养提供了哪些好处?

知识窗：固体培养基、培养皿和纯培养

柯赫第一次在固体培养基（solid culture medium）上培养细菌。他早期使用土豆片作为固体培养基有很多缺点。除了对细菌的选择性太强以外，土豆上往往长出很多真菌。因此需要更为可靠和重复性更好的方式培养细菌，他采用琼脂解决了问题。

柯赫最初采用凝胶作为培养各种病原菌的营养液的固化剂，并建立了一种制备固体平板的方法，他用玻璃钟罩和玻璃盒子来防止污染（见图 1.13c）。营养明胶是分离和研究各种不同细菌的很好的培养基，但也有一些缺点，其中最主要的是在 37℃时不能凝固，而此温度是培养大多数人体病原菌的最适温度。因此需要筛选更多种类的固化剂作固体培养基，随后人们找到了琼脂。

琼脂来自于红藻多糖，19 世纪被广泛用来作为凝胶剂。Walter Hesse 首次将琼脂用在培养基中用作固化剂。但是真正建议用琼脂而不用明胶的是 Walter 的太太 Pannie。Pannie Hesse 曾经用琼脂制备果冻，当它被用于制备固体培养基的时候，优越的特性很快就表现了出来。Hesse 将他们的发现写信告诉了柯赫，柯赫很快就将琼脂用于他的研究，包括分离结核分枝杆菌（图 1.13）。

琼脂具有很多其他的优点，使得它很适合于作为微生物培养基的固化剂。特别是它

在体温的情况下也能凝固，经过灭菌过程的熔解后，温度保持在45℃时仍然能保持液体状态，此时可以将它倒入无菌培养皿中制备平板。另一方面，很多细菌都能水解动物明胶使其液化，而大多数细菌却不能降解琼脂。因此，琼脂很早就应用在微生物学中，一直到现在还被用于保存细菌纯培养物。

1887年Richard Petri在他发表的一篇简短论文中描述了他对柯赫平板技术的改进。Petri的发明非常有用，他采用的是双面盘制作的培养皿。这种培养皿的优点很明显，它能很容易地被堆积起来并与培养基分别灭菌，然后将灭菌的培养基倒入小盘子中，大盘是用来盖在小盘上面防止污染的。长在平板内的琼脂培养基上的菌落能够与空气完全接触，很容易对菌落进行进一步研究。这种方法一直沿用至今而没有太多的改进，这是因为不管是用可重复利用的、可干热灭菌的玻璃培养皿，还是一次性的、用环氧乙烷灭菌的塑料培养皿，都是微生物实验室的主要用具。

最后还应提到的是，柯赫非常关注他的纯培养方法与微生物系统研究的联系。他发现，颜色、形态大小各不相同的菌落能够形成纯种，可以通过菌落特征的不同将它们区分开。不同菌落的细胞在显微结构和对营养及温度的需求方面也不相同。柯赫意识到微生物中的这些不同之处与分类学家们在对大型生物，如动物和植物的分类过程中建立起来的种的标准很相符。用他自己的语言描述是，“所有细菌，如果用相同的培养基在相同的条件下培养时表现出与其他细菌不同的特征，这些细菌就可以被命名为一个种、亚种、型或者是其他合适的命名”。柯赫同时还意识到，通过研究纯培养人们不仅可以证明特定微生物能引起特定疾病及一些其他方面的特征。这一颇有建树的思想，对于人们在很短时间内就承认微生物作为一门独立的学科起到了重要作用。

柯赫发现的固体培养基及它所强调的纯培养已经远远超出了医学细菌学的范围。它的发明为细菌分类学、遗传学和其他一些分支学科的发展提供了非常关键的工具。实际上，整个微生物学领域都应该感谢柯赫和他的同事们所表现出来的在领悟纯培养意义及在建立微生物学最基本的研究方法方面的贡献。

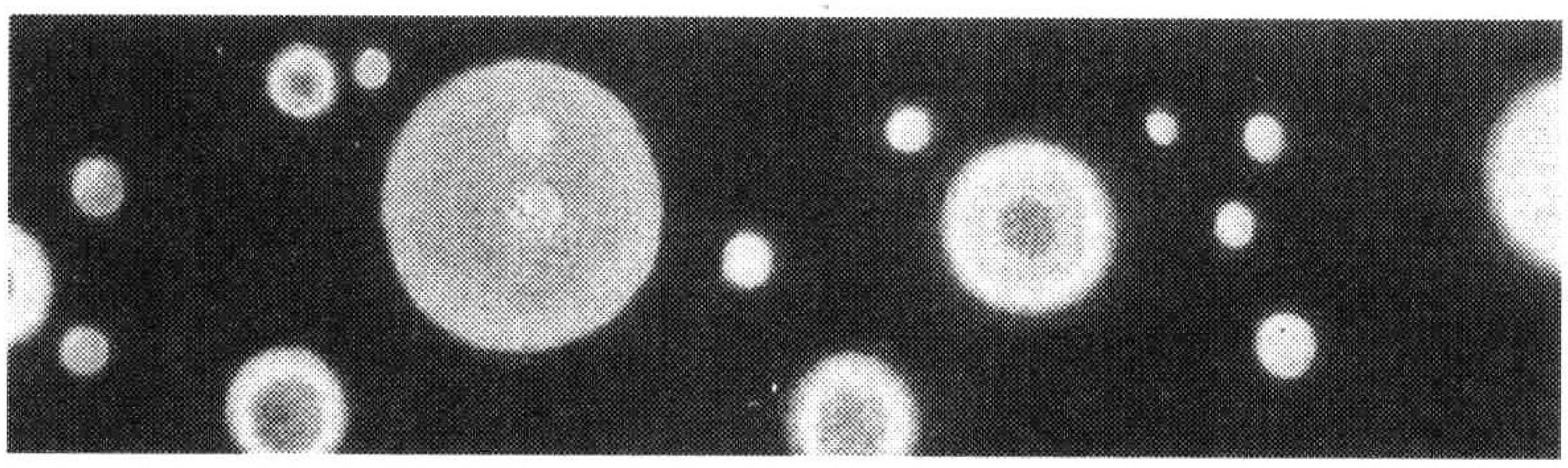


图1　柯赫的同事 Walter Hessee 拍摄的平板上形成的真菌和细菌菌落照片。这些照片是1882年Hesse开始研究德国柏林空气中微生物组成时得到的。

1.7　微生物多样性和普通微生物学的兴起

从19世纪至20世纪，随着微生物学的发展，我们对微生物多样性的了解明显深入。此时形成了很多微生物学的分支学科，最终出现了现在的分子微生物学。

该领域的两个科学家马蒂纳斯·贝叶林克（Martinus Beijerink）和威诺格拉德斯基（Sergei Winogradsky）在这一转化过程中起了主导作用。这两位早期的微生物学家都致力于研究土壤和水中的微生物，并且都因为在细菌多样性方面的研究成果而被后人所敬仰。从那时开始一直到分子微生物学出现的一段时期是普通微生物学（general microbiology）的全盛期。普通微生物学主要研究非医学微生物，重点是研究微生物的多样性和微生物生理。

贝叶林克和富集培养技术

贝叶林克（1851～1931 年）是代夫特工业学院的教授，开始接受的是植物学方面的训练。因此，他的微生物研究生涯是从植物微生物开始的。或许他对微生物学领域的最大贡献是对富集培养（enrichment culture）的清楚阐释。富集培养过程是通过一种选择性的方式从天然样品中分离微生物，特别要注意养分和培养条件的需求（18.1 节）。

贝叶林克采用富集培养的方法从土壤和水中分离了很多纯培养物，包括（图 1.14）硫酸盐氧化菌、硫还原菌、根瘤固氮细菌、乳酸杆菌、绿藻和许多其他微生物。在使用选择性过滤技术研究烟草花叶病的过程中发现，侵染物不是细菌而是一种能够进入到宿主细胞中并需要活植物才能复制的微生物。在这一工作中，贝叶林克不仅第一次描述了病毒而且第一次阐明了病毒的定义。

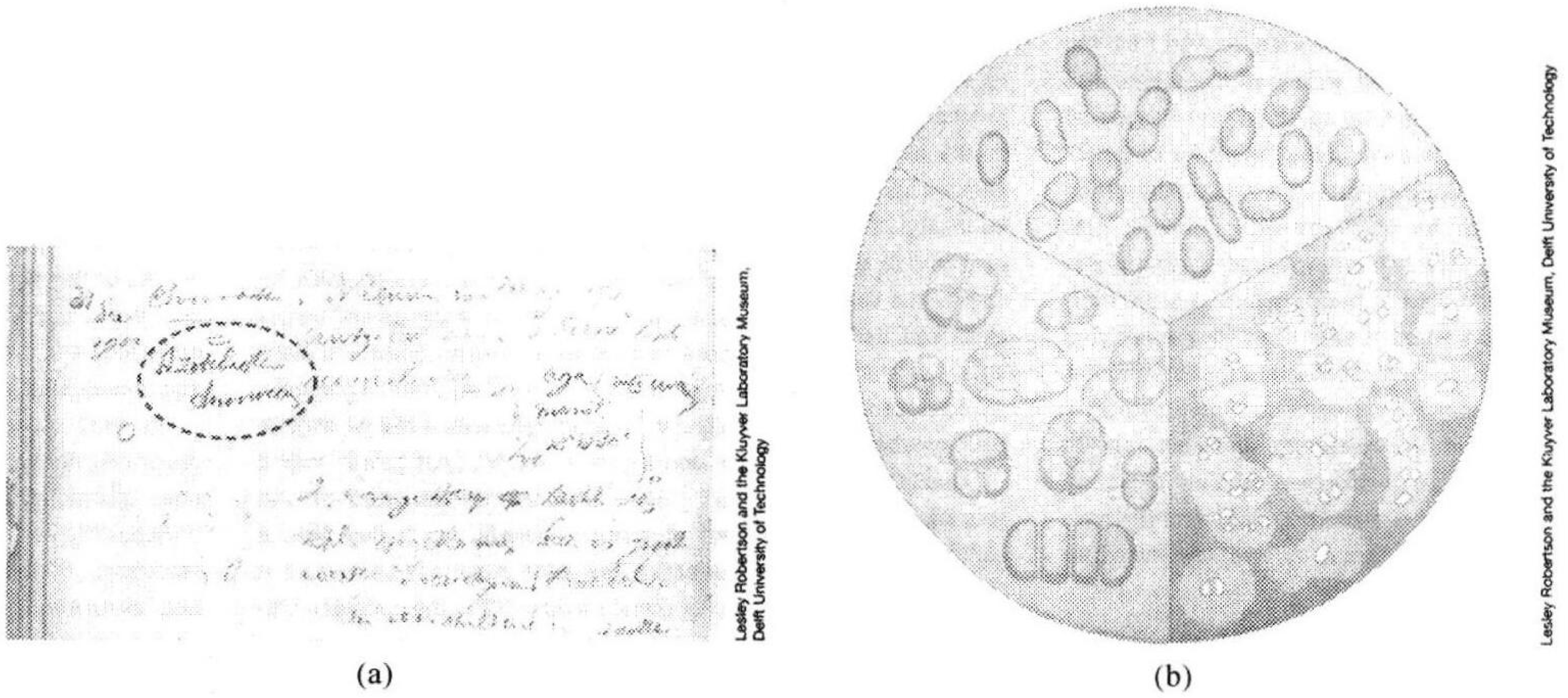


图 1.14 贝叶林克与固氮菌属（*Azotobacter*）。（a）1900 年 12 月 31 日贝叶林克的试验手册中一页的部分内容，里面描述了他对褐球固氮菌（*Azotobacter chroococcum*）的观察结果。在这一页上贝叶林克首次使用了这一命名。在图 12.19a 中将贝叶林克描绘的几对 *A. chroococcum* 细胞与固氮菌属细胞的显微图片进行了比较。（b）贝叶林克的弟弟画的 *A. chroococcum* 细胞，贝叶林克用这些图片进行讲座，当时还没有现在讲课时用的幻灯片、计算机及投影仪。

威诺格拉德斯基和化能无机营养的概念

威诺格拉德斯基（1856～1953 年）与贝叶林克有相同的科学兴趣，他成功地分离出几种关键细菌，尤其对含氮和硫化合物的循环感兴趣（图 1.15 和图 1.16）。他的研

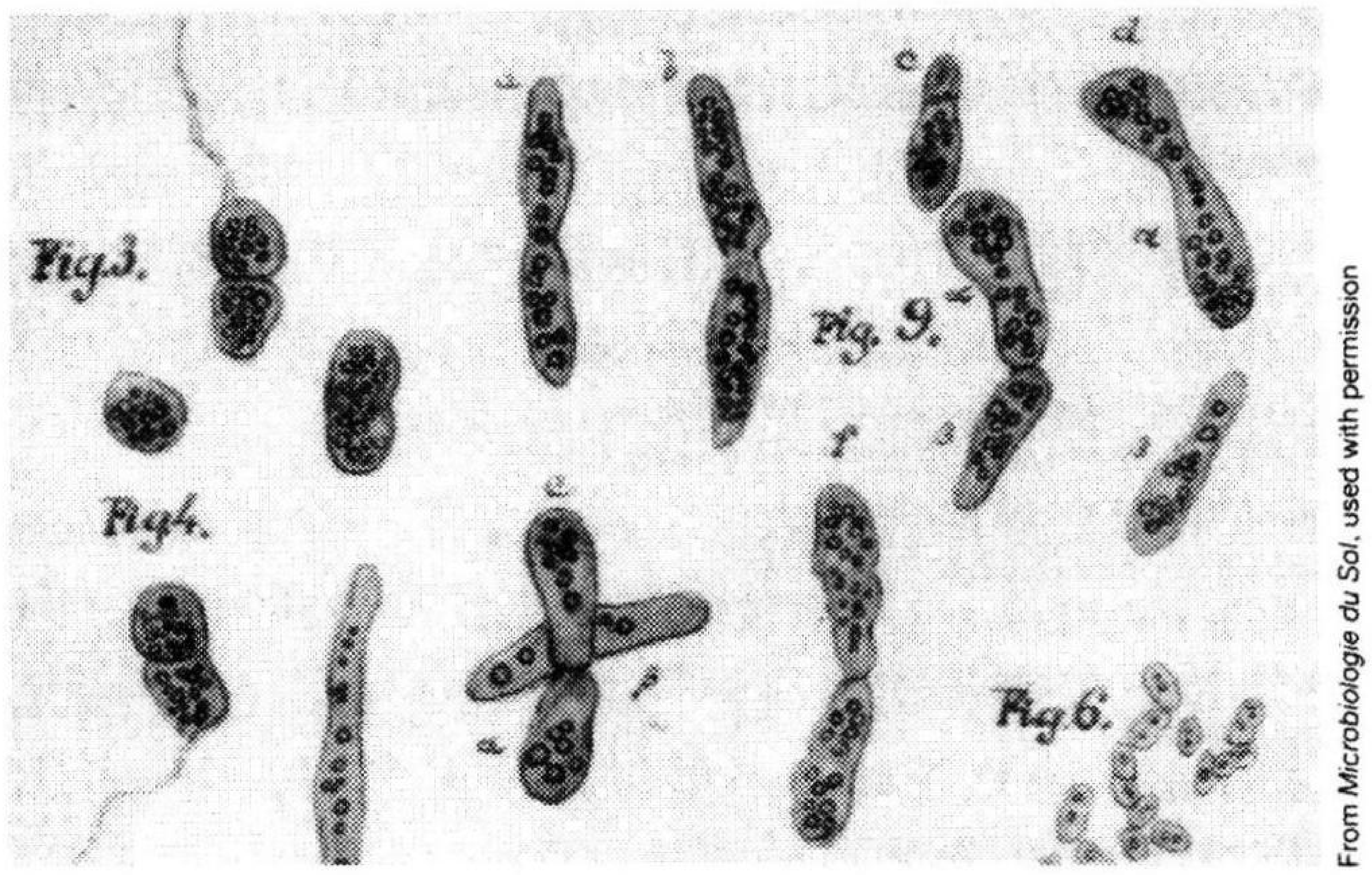


图 1.15　人工上色的紫色光合细菌。原始的图片由威诺格拉德斯基于 1887 年制作，后来由他的妻子 Helene 复制及人工着色。图片中包括产色菌属（*Chromatium*）细菌，如 *C. okenii*（图 3 和图 4）。这些属的细菌今天仍然可以被识别出来。图 12.4a 中将这些着色的 *C. okenii* 细胞与显微照片进行了比较。

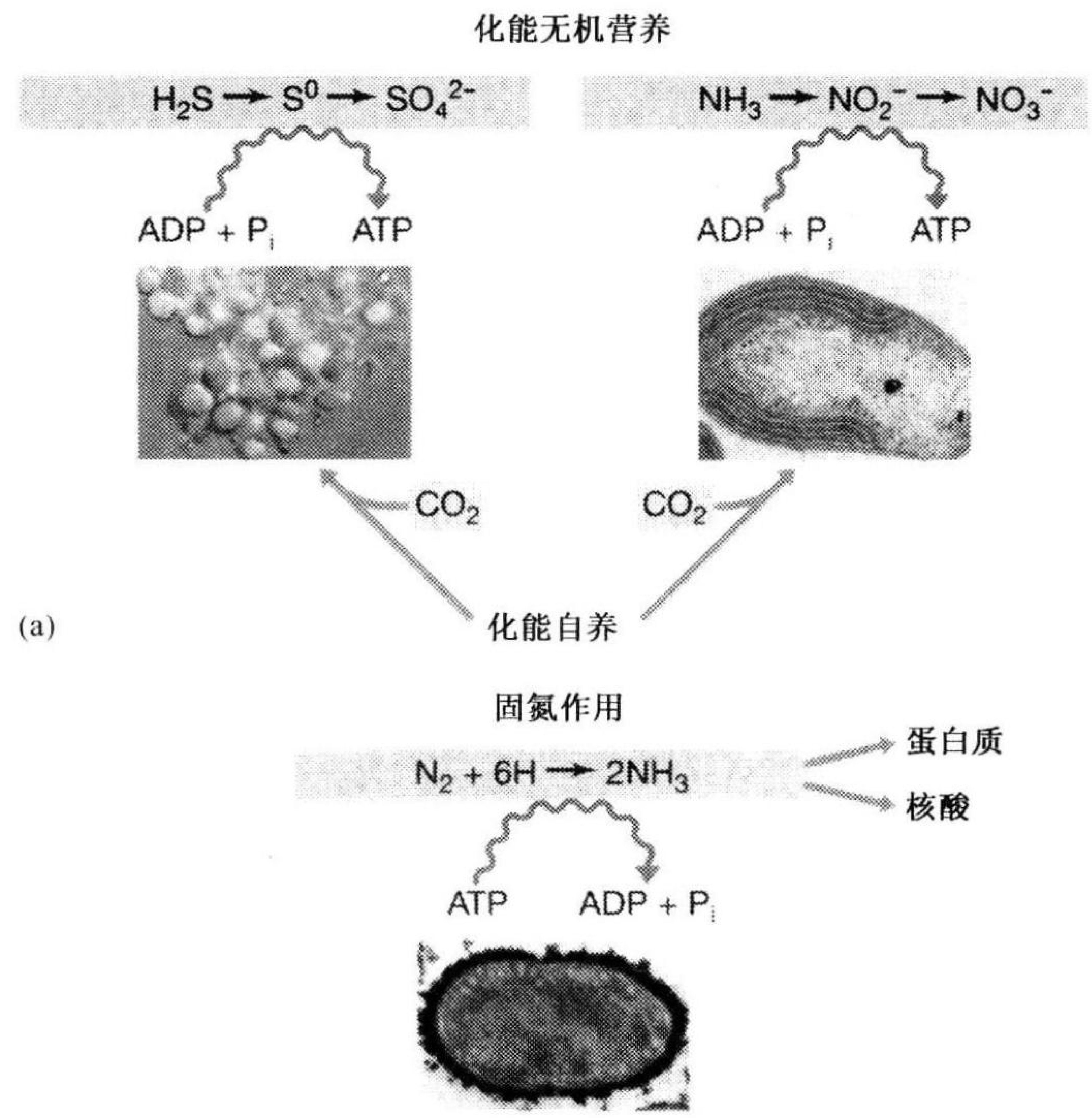


图 1.16　威诺格拉德斯基建立的主要概念。（a）化能无机营养和化能自养。氧化含硫和氮化合物产生能量（ATP），细胞的碳源来自于二氧化碳。左边是无色菌属（*Achromatium*），右边是硝化细菌属（*Nitrobacter*）。（b）固氮作用。此过程消耗 ATP 但允许细胞利用氮气满足氮源的需求。照片中的固氮菌（Azotobacter）是一种需氧的固氮菌（图 1.14）。

究工作证明，细菌可能是生物地质化学的重要因素。他还利用自己敏锐的洞察力揭示了微生物在生物地质化学过程的代谢意义（metabolic significance）。从他研究硫氧化细菌开始就提出了化能无机营养（chemolithotrophy）的概念，即通过无机化合物的氧化将能量储存起来的一个过程（图 1.16a）。从固氮的化能无机营养过程中得出一个结论，固氮菌的碳源于二氧化碳。因此威诺格拉德斯基认为这些微生物是自养型的，我们现在叫做化能自养型微生物，以便与光能自养型微生物区分。

威诺格拉德斯基还采用富集培养的方法分离到了第一个固氮菌［厌氧微生物巴氏梭菌（*Clostridium pasteurianum*）］，并系统表述了细菌固氮的概念（图 1.16b）。威诺格拉德斯基一直活到 100 岁，发表了很多科学论文并且还写了一部专题论文《土壤微生物学》，这本书是微生物学的一个里程碑，书里包括了很多他一生中已经分离的，或者是在富集培养过程中研究过的微生物的原始照片（图 1.15）。

表 1.1 总结了微生物学领域从列文虎克到当代学者的一些重要发现。

表 1.1 微生物 300 年：微生物学一些主要的文章，1684～2000[a]

年份	研究者	发现
1684	Antoni van Leeuwenhoek	发现细菌
1798	Edward Jenner	天花接种
1857	Louis Pasteur	乳酸发酵的微生物学
1860	Louis Pasteur	乙醇发酵中酵母的作用
1864	Louis Pasteur	解决自然发生说的争论
1867	Robert Lister	外科手术中的无菌原理
1876	Ferdinand Cohn	内生孢子的发现
1881	Robert Koch	在纯培养中研究细菌的方法
1882	Robert Koch	结核病病因的发现
1882	Elie Methchnikoff	吞噬作用
1884	Robert Koch	柯赫定律
1884	Christian Gram	革兰氏染色方法
1885	Louis Pasteur	狂犬病疫苗
1889	Sergei Winogradsky	化能无机营养概念
1889	Martinus Beijerinck	病毒概念
1890	Emil Von Behring 和 Shibasaburo Kitasato	白喉抗毒素
1890	Sergei Winogradsky	化能无机自养生长
1901	Martinus Beijerinck	富集培养
1901	Karl Landsteiner	人血组分
1908	Paul Ehrlich	化疗剂
1911	Francis Rous	第一个癌症病毒
1915/1917	Frederick Twort/Felix d'Hérelle	发现细菌病毒（噬菌体）
1928	Frederick Griffith	肺炎球菌转化的发现
1929	Alexander Fleming	青霉素的发现
1931	Cornelius van Niel	在不产生氧气的光合磷酸化中以 H_2S 作为电子供体
1935	Gerhard Domagk	磺胺类药剂
1935	Wendall Stanley	烟草花叶病毒的结晶
1941	George Beadle 和 Edward Tatum	一个基因一个酶假设
1943	Max Delbruck 和 Salvador Luria	细菌中可遗传特性

续表

年份	研究者	发　现
1944	Oswald Avery，Colin Macleod，Maclyn McCarty	对 Griffith 研究工作的解释——DNA 是遗传物质
1944	Selman Waksman 和 Albert Schatz	链霉素的发现
1946	Edward Tatum 和 Joshua Lederberg	细菌的接合
1951	Barbara McClintock	转座因子的发现
1952	Joshua Lederberg 和 Norton Zinder	细菌的转导
1953	James Watson，Francis Crick，Rosalind Franklin	DNA 结构
1959	Arthur Pardee，Francois Jacob，Jacques Monod	抑制蛋白质的基因调控
1959	Rodney Porter	免疫球蛋白的结构
1959	F. Macfarlane Burnet	克隆选择理论
1960	Francois Jacob，David Perrin，Carmon Sanchez，Jacques Monod	操纵子概念
1960	Rosalyn Yalow 和 Solomon Bernson	放射性免疫分析方法的建立
1961	Sydney Brenner，Francois Jacob 和 Matthew Meselson	信使 RNA 和核糖体作为蛋白质合成的位点
1966	Marshall Nirenberg 和 H. Gobind Khorana	遗传密码的发现
1967	Thomas Brock	在沸腾的温泉中发现生长的细菌
1969	Hovard Temin，David Baltimore，Renato Dulbecco	发现反转录病毒和反转录酶
1969	Thomas Brock 和 Hudson Freeze	分离到水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）作为 *Taq* DNA 聚合酶的来源
1970	Hamilton Smith	限制性内切核酸酶作用的特异性
1973	Stanley Cohen，Annie Chang，Robert Helling 和 Herbert Boyer	重组 DNA
1975	Georges Kohler，Cesar Milstein	单克隆抗体
1976	Susumu Tonegawa	免疫球蛋白基因的重排
1977	Carl Woese 和 George Fox	古生菌的发现
1977	Fred sanger，Steven Niklen，Alan Coulson	DNA 序列分析方法
1981	Stanley Prusiner	朊病毒的鉴定
1982	Karl Stetter	分离到第一个最适生长温度大于 100℃的原核生物
1983	Luc Montagnier	HIV 的发现，AIDS 病因
1985	Kary Mullis	发明聚合酶链反应
1986	Norman Pace	分子微生物生态学
1992	Jed Fuhrman 和 Edward Delong	发现海洋古生菌
1995	Craig Venter 和 Hamilton Smith	获得细菌基因组的全序列
1999	The Institute for Genomic Research (TIGR) 及其他	已经完成的微生物基因组测序和正在进行的超过 100 多个
2000	Edward Delong	发现变形视紫红质
2004	Craig Venter 及其他	第一个大规模的环境基因组：the Sargasso Sea

a. 主要的参考文献包括：Brock T D. 1961. Milestones in Microbiology，Prentice Hall，Englewood Cliffs，NJ；Brock T D. 1990. Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，NY，年份参考的是论文发表的时间。

概念检查

贝叶林克和威诺格拉德斯基研究了土壤和水中的细菌并建立了富集培养技术分离不同生理群体的微生物。微生物学的一些主要概念都是在此时期产生，包括富集培养、化能无机营养和固氮作用。

◆ 什么是富集培养技术？

◆ 在观察图 1.16 时想一想，为什么硫氧化过程和硝化作用被认为是化能无机营养而固氮作用则不是？（提示：注意涉及 ATP 的每个反应过程）

1.8 现代微生物学

20 世纪微生物学领域的两个方向——应用微生物学（applied microbiology）和基础微生物学（basic microbiology）有了迅速发展。

应用微生物学主要分支学科的发展

柯赫定律的应用促进了应用微生物学的广泛发展。例如，出现了医学微生物学（medical microbiology）和免疫学（immunology）。随着这些学科的发展，人们发现了许多新的病原细菌，对病原菌如何感染人体以及人体如何防预抵抗感染的机制进行了研究。另外，在农业微生物（ agricultural microbiology）领域也取得了一些应用性的研究进展，这些研究进展主要得益于贝叶林克和威诺格拉德斯基的研究。对农业微生物的研究使人们了解到，土壤中的微生物过程，如固氮作用有利于植物生长。20 世纪后期对土壤微生物的研究使人们发现了抗生素和其他重要的化学物质，这些发现导致了工业微生物（industrial microbiology）的产生。工业微生物主要是利用微生物的生长产生大量具有商业价值的产品。

土壤微生物学的发展同样为研究湖泊、河流和海洋微生物学奠定了基础，即水生生物学（aquatic microbiology）和海洋微生物学（marine microbiology）。水生微生物学的分支之一就是研究怎样处理污泥和为人类社会提供安全饮用水。随着人们对于生物多样性和自然环境中微生物活动的了解，20 世纪六七十年代又出现了微生物生态学（microbial ecology）。随着分子微生物学的融入，微生物生态学正经历着它的第二个黄金时代（图 1.17）。

微生物学中的基础科学分支

除了这些应用领域的研究进展，20 世纪许多微生物的基础分支学科也得到了发展，尤其是那些应用分子生物学工具和概念的领域。图 1.17 总结了过去 65 年中的一些标志性的事件。

第二次世界大战以来又发现了很多微生物，使微生物生态系统得到了很大的充实并构建了生命系统发育树（图 1.17）。对微生物营养和代谢产物的研究促进了微生物生理学（microbial physiology）的发展。对微生物物理和化学结构，即细胞学（cytology）

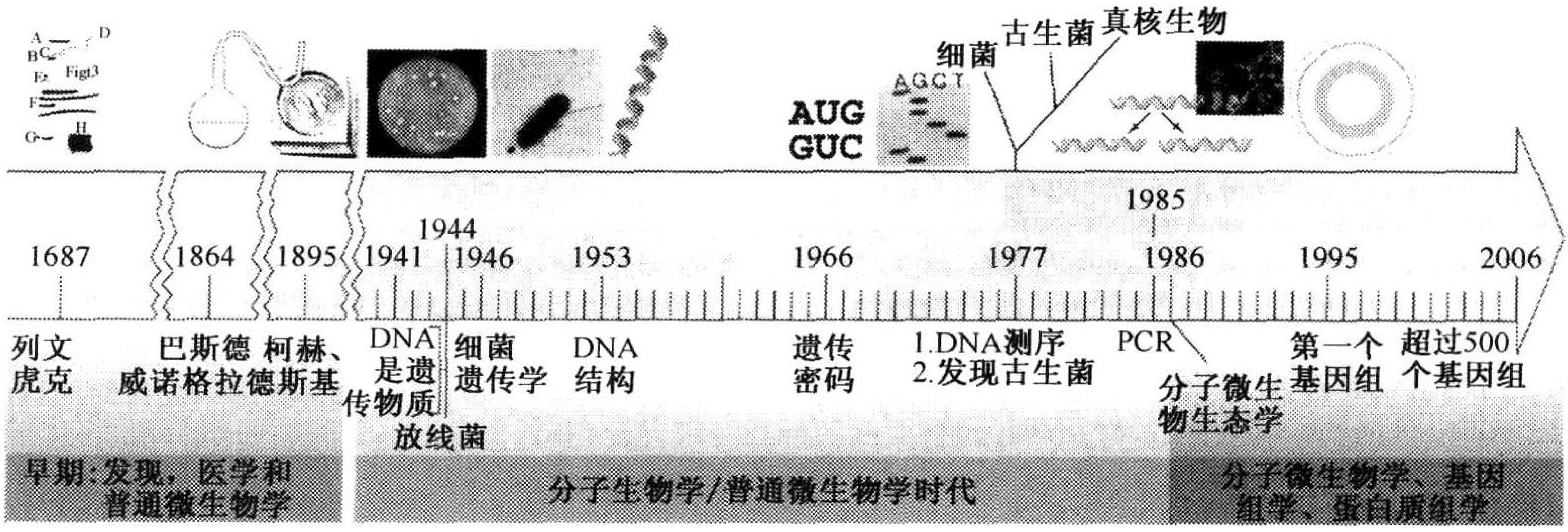


图 1.17　近 65 年来微生物学的一些标志性事件。时间上面的插图或图片是发现的主要代表。每个发现都已经或者将要在后面的章节中涉及。

认识的加深；微生物酶的发现及对这些酶催化的反应认识，即微生物生物化学（microbial biochemistry）的不断加深对今天微生物学的应用也产生了很大影响。

19 世纪中期，一个飞速发展的重要基础领域是细菌遗传和变异，这是细菌遗传学（bacterial genetics）的一个分支学科。尽管 19 世纪早期人们对细菌遗传学的一些方面有了一定了解，但是直到 1850 年人们才发现细菌遗传物质的交换，细菌遗传学才成为一个主要的研究领域。19 世纪 50 年代细菌遗传学、生物化学和生理学得到了快速发展。到了 60 年代，这些领域的发展为理解 DNA、RNA 和蛋白质的合成提供了丰富的资料。分子生物学的兴起在很大程度上是细菌学研究的扩展。

20 世纪对病毒的研究也得到蓬勃发展。尽管贝叶林克发现病毒是在 100 年以前，但是直到 20 世纪中叶人们才弄清楚了病毒的实质。很多相关工作都围绕侵染细菌的噬菌体（bacteriophage）展开。研究者发现，病毒的侵染过程与遗传物质的转染相似，很多关于病毒和其他遗传元素之间的关系都是通过研究噬菌体阐明的。

分子微生物学时代

19 世纪 70 年代对细菌生理学、生物化学和遗传学已经有了相当的了解，有可能通过试验手段对细胞的遗传物质进行操作。限制性内切核酸酶的发现使人们能将外源 DNA 转入细菌，并控制它们的复制，这一发现同时也促进了生物技术（biotechnology）领域的发展。与此同时，核酸测序技术的建立对生物学的所有领域都产生了影响。微生物学中，测序技术帮助人们揭示了原核生物之间的进化关系，由此产生了一些新的生物分类学观念。测序技术的发展使得对不同生物的基因进行对比分析的基因组学（genomics）诞生。大量已有的基因组信息正在为医学、微生物生态学、工业微生物学及生物学的众多其他领域的发展注入新的活力。现代基因组学已经诞生了一个新的分支学科——蛋白质组学（proteomics），它是研究细胞中蛋白质表达的科学。在后面的第 15 章中将要详细地讨论这两部分内容。

新前沿

350 年历史的微生物学，不仅使我们对微生物有了令人吃惊的认识，它还带来了很

多新的有益及有害的挑战。一方面，新出现的疾病如 SARS 和以前的 AIDS，它们都似乎在没有征兆的情况下出现，对我们研究掌握的所谓微生物疾病的尖端知识提出挑战。另外，新的研究发现促使我们要在最基本的水平上了解细胞的活动。另一方面，新发现的细菌极大地扩展了我们对微生物多样性的认识。随着基因组学对最小基因组的揭示，我们将会很快确定组成生命的先决条件。在实验室中创建细胞的目标还会很远吗？

正如已故的进化生物学家 Stephen Jay Gould 所提出的那样，“现在是细菌的时代”。学习科学多么令人兴奋，欢迎进入微生物世界！

概念检查

20 世纪中期到晚期，基础和应用微生物学相互作用开创了分子微生物学的新时代。

◆ 列出与下面领域相关的微生物学下属学科：代谢、酶学、核酸和蛋白质合成、微生物及其自然环境。

复习题

1. 列出 6 个主要的生命特征。哪些是所有细胞都具有的？哪些是某些细胞才具有的？（见 1.1 节和 1.2 节）
2. 可以把细胞看成是机器或者编码设备吗？请解释二者之间的不同。（见 1.2 节）
3. 细胞中的翻译过程需要什么？翻译过程的产物是什么？（见 1.2 节）
4. 什么是生态系统？在生态系统中微生物是以纯培养的形式存在吗？微生物会对生态系统产生什么影响？（见 1.3 节）
5. 你如何使你的朋友相信微生物不仅仅是一种病原？（见 1.4 节）
6. 胡克和列文虎克对微生物学的贡献有哪些？科恩对微生物学的贡献有哪些？（见 1.5 节）
7. 什么是纯培养及如何得到纯培养？为什么获得纯培养对于微生物学的发展非常重要？（见 1.6 节）
8. 解释一下用巴斯德烧瓶研究自然发生说的原理？（见 1.6 节）
9. 为什么固体培养基的发明对于将微生物学发展为一门科学起着非常重要的作用？（见 1.6 节）
10. 什么是柯赫定律，它对微生物学的发展产生了什么影响？为什么到今天这些法则还很适用？（见 1.6 节）
11. 请描述早期微生物学家贝叶林克对微生物学的贡献。（见 1.7 节）
12. 简述威诺格拉德斯基的贡献。（见 1.7 节）
13. 第二次世界大战以来微生物学有哪些重要进展？（见 1.8 节）

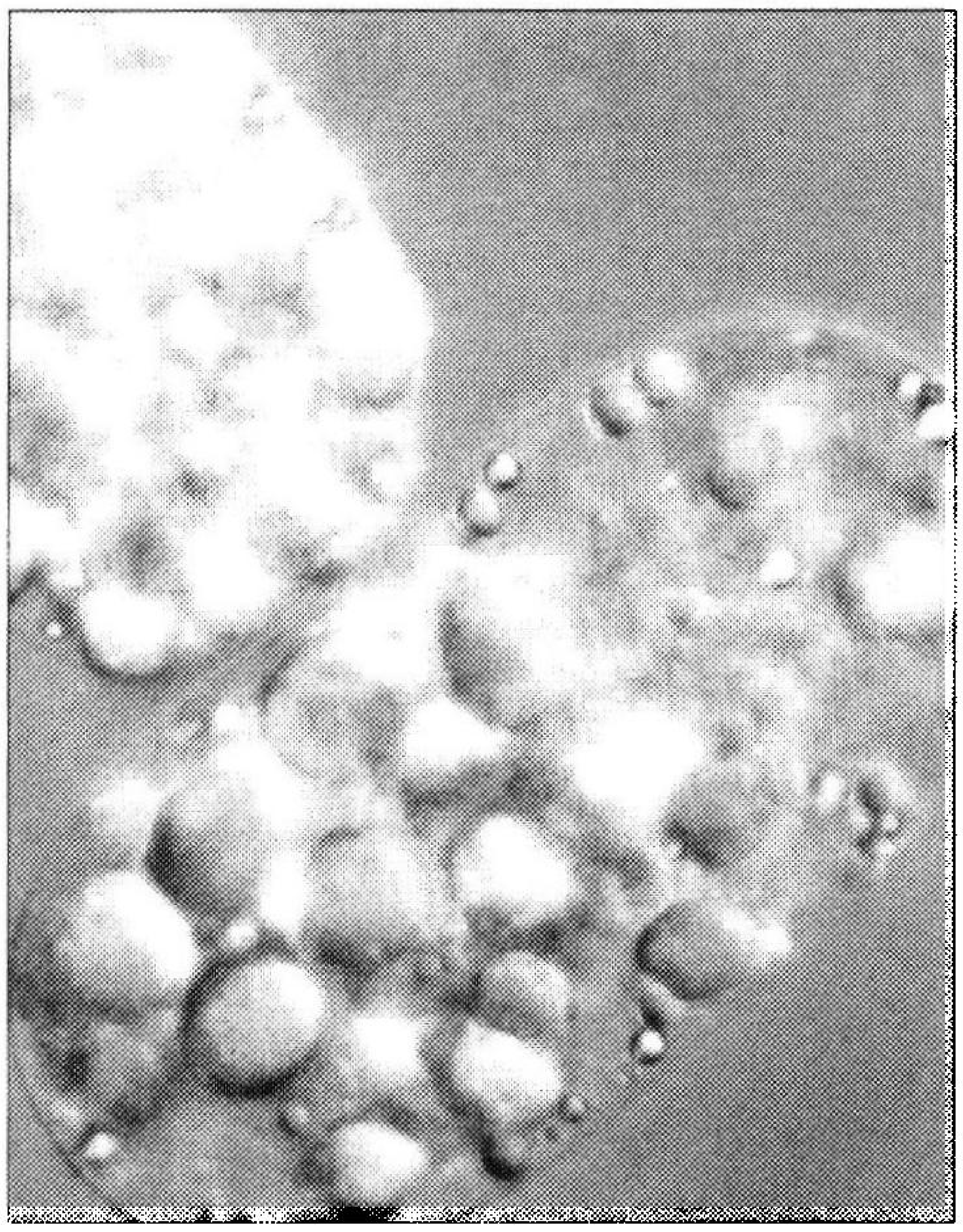
应用题

1. 有关自然发生说的试验对微生物学的发展起到非常重要的作用，对微生物学的方法、生命的起源和食品保藏等方面也发挥了重要的作用。简单解释一下对各个不同方面的影响。
2. 描述柯赫用来证明结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）与结核病相关的证据。如果他研究结核病时没有相应的工具，其证据会在哪些方面有所不足？

（魏东盛　译，陈月华　校）

2

微生物生命概论



微生物的多样性非常巨大，它们通过各种方式使自己的生命符合化学和物理法则。

I　细胞结构与进化史

II　微生物多样性

词汇表

古生菌域（***Archaea***）：一群在系统发育上相关但与细菌域截然不同的原核生物
真细菌域（***Bacteria***）：一群在系统发育上相关但与古生菌域截然不同的原核生物
化能无机营养生物（**chemolithotroph**）：能够通过氧化无机化合物获得能量的生物
化能有机营养生物（**chemoorganotroph**）：能够通过氧化有机化合物获得能量的生物
染色体（**chromosome**）：一种含有保证细胞功能的重要基因的遗传因子
细胞质（**cytoplasm**）：细胞的液体部分，细胞膜构成了它的边界，但不包括细胞核（如果核存在）
域（**domain**）：生物学分类的最高级
内共生（**endosymbiosis**）：线粒体和叶绿体起源于细菌后裔的过程
真核生物域（***Eukarya***）：包括所有真核有机体的领域
真核生物（**eukaryote**）：具有膜包围的细胞核，通常还有其他细胞器的生物体
进化（**evolution**）：随着时间的推移，遗传上的改变导致了在一个物种中新种或变种的产生
嗜极端生物（**extremophile**）：在一种或多种极端环境下最适生长的生物
基因组（**genome**）：有机体中全部的基因
形态学（**morphology**）：细胞形态
拟核（**nucleoid**）：构成细菌和古生菌染色体的 DNA 聚集团
细胞核（**nucleus**）：真核细胞中由膜包被的包含染色体的结构
细胞器（**organelle**）：真核细胞质中的一些膜包被形成的结构单位，如线粒体或者叶绿体
光养生物（**phototroph**）：由光获得能量的有机体
系统发生（**phylogeny**）：有机体之间的进化关系
质粒（**plasmid**）：一种对生长非必需的染色体外遗传因子
原核生物（**prokaryote**）：缺少真正细胞核的生物体
变形菌门（**Proteobacteria**）：细菌的一大门，包括许多常见的革兰氏阴性菌，如大肠杆菌
核糖体（**ribosome**）：细胞质中执行蛋白质合成功能的结构

I　细胞结构与进化史

本章将介绍细胞结构与功能和微生物多样性方面的一些主要概念，比较微生物细胞的内部结构，对细胞和病毒进行区分，探讨生命进化树，并讨论一些对生命和地球产生影响的主要微生物类群。

细胞结构方面的知识来自于光学和电子显微照片（micrograph），因此本章提供了这些照片。我们还保留了关于显微技术的一些普通的内容，将它作为对细胞结构进行详细介绍之前的一个序幕。

2.1　细胞成分和病毒结构

细胞在很多方面都相同，包含了很多功能相似的部分。细胞都有一层称之为细胞质膜（cytoplasmic membrane）的屏障将内部与外部区分开（图 2.1）。营养物质和其他所

需物质的进入和废物的排出都是通过细胞质膜实现的。细胞中被细胞质膜包裹所形成的结构是一个由很多物质组成的复杂结构，叫做细胞质。这些物质和结构或溶解或悬浮在细胞质中行使细胞功能。

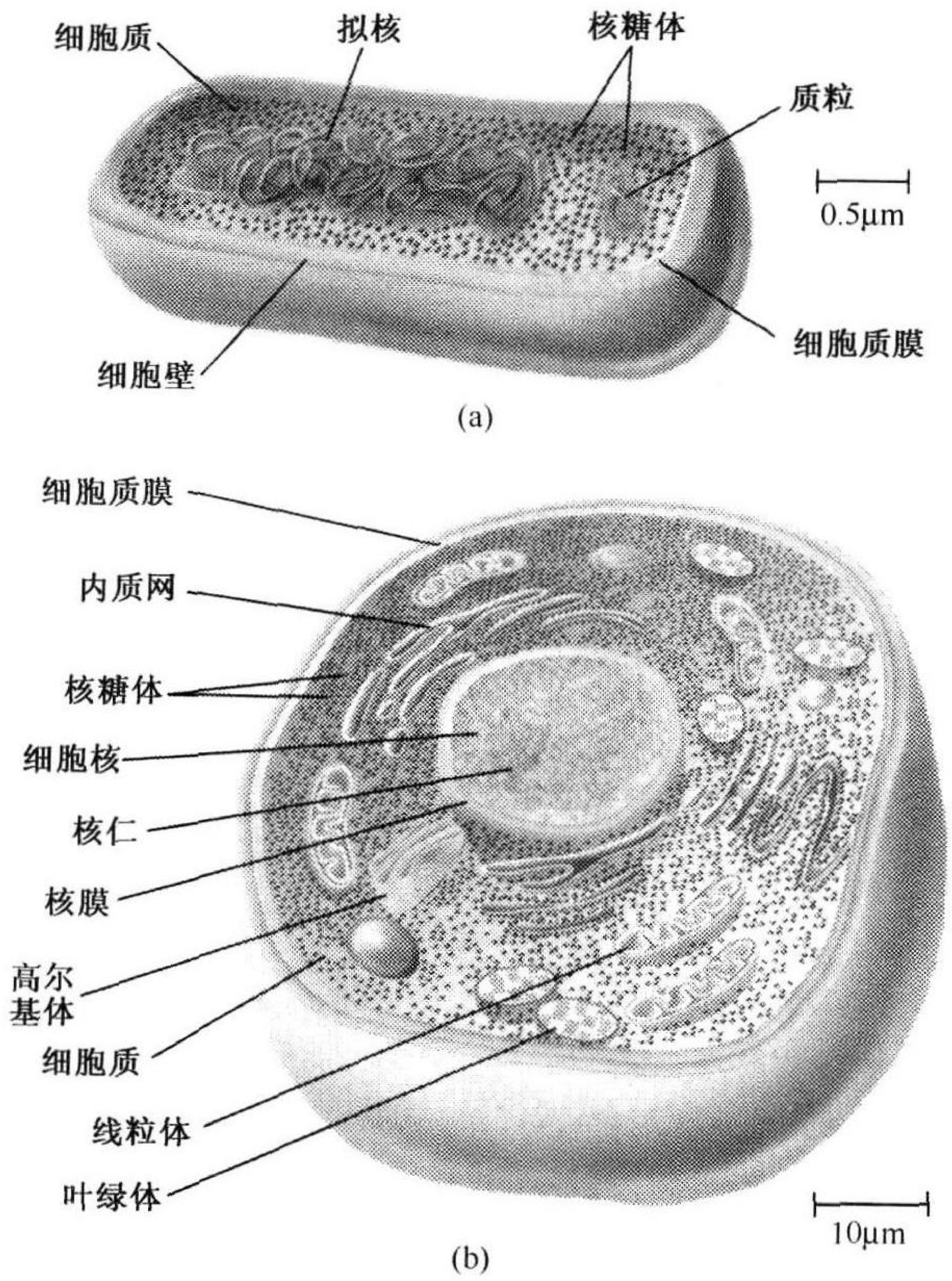


图 2.1 微生物细胞的内部结构。(a) 原核细胞示意图。(b) 真核细胞示意图。注意二者在大小和内部结构的差别。

溶解在细胞质中的物质主要包括大分子（特别重要的两种是核酸和蛋白质)、小分子有机物（主要是大分子物质的前体）和无机离子。蛋白质合成的工厂核糖体（ribosome）是悬浮在细胞质中的颗粒状结构，由 RNA 和几种不同的蛋白质构成。在蛋白质合成（protein synthesis）的关键步骤中，核糖体与细胞质中的蛋白质、信使 RNA 和转运 RNA 相互作用（图 1.4)。

细胞壁（cell wall）赋予细胞一定的结构力。它具有相当的通透力并位于细胞膜的外部（图 2.1)，是比细胞膜坚硬的保护层。植物和很多微生物细胞具有细胞壁，而大多数的动物细胞则没有。但是动物细胞可以通过细胞质中的细胞骨架（cytoskeleton）来加强结构。

真核细胞

研究细胞的内部结构时会发现两种不同类型的细胞：原核生物（prokaryote）和真核生物（eukaryote）细胞（图 2.1)。真核细胞一般要比原核细胞大且在结构上也相对

复杂。真核微生物包括藻类（algae）、真菌（fungi）和原生动物（protozoa）（图 2.23 和图 2.24），所有的多细胞植物和动物都是由真核细胞构成的。第 14 章将详细讨论这些问题。

真核细胞的一个重要特征是含有由细胞膜包被的细胞器，而原核细胞不存在这些细胞器（organelle）。细胞器包括最为重要的细胞核（nucleus）、线粒体（mitochondria）和叶绿体（chloroplast）（后者出现在光合细胞中）（图 2.1b，图 2.2c）。细胞核是遗传物质（DNA、基因组）的储存场所，同样也是转录的场所。线粒体和叶绿体则分别在呼吸作用和光合作用产生能量的过程中起着特殊作用。

原核细胞

与真核细胞比较，原核细胞的内部结构比较简单，缺少膜包被的细胞器（图 2.1a 和图 2.2a，b）。原核生物包括真细菌域（*Bacteria*）和古生菌域（*Archaea*）。尽管细菌域和古生菌域的一些种具有与原核细胞相同的结构，但它们的进化史明显不同。本书中 bacteria 中的字母 b 小写时的含义与原核生物（prokaryote）相同，而 *Bacteria*（B 大写并且斜体）指的是与古生菌域不同但有亲缘关系的一类原核生物（见 2.3 节）。

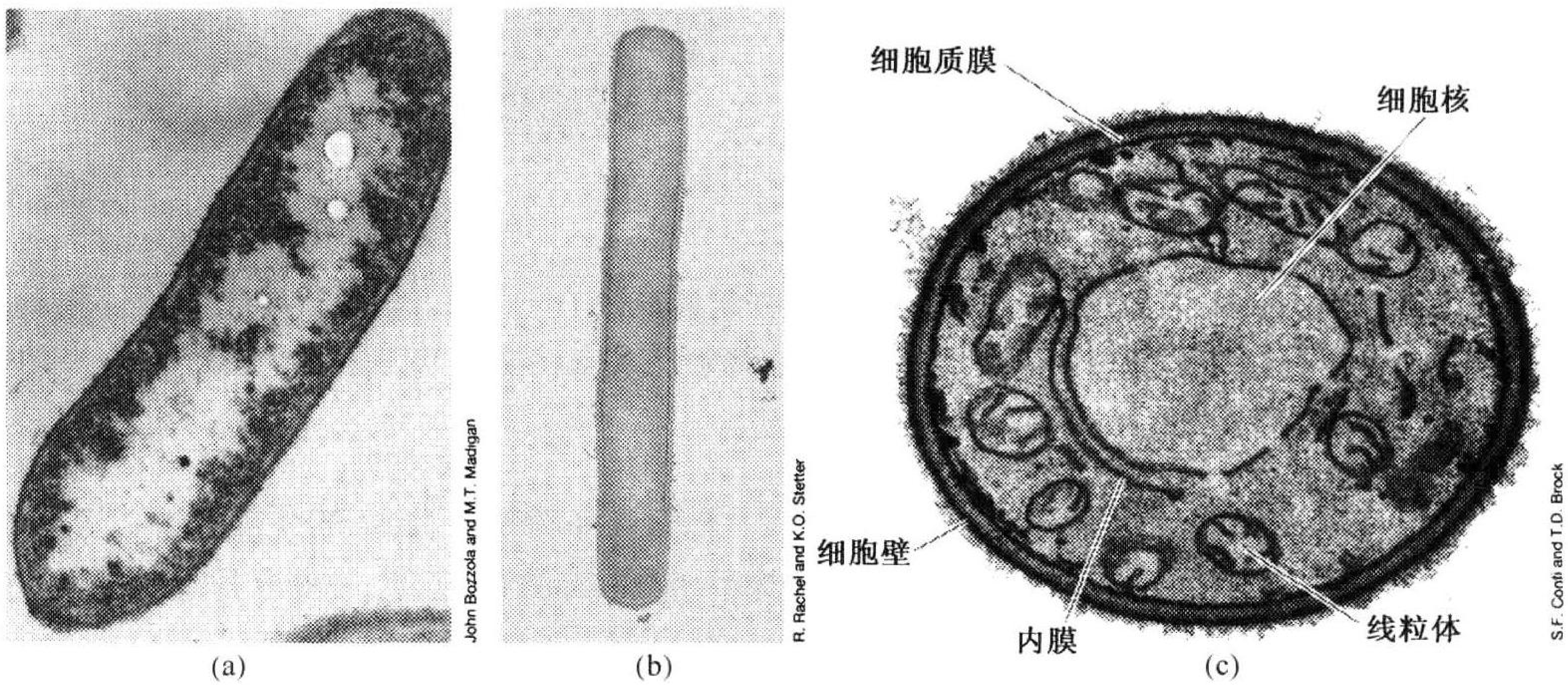


图 2.2　来自不同生命域的细胞切片的电镜照片。（a）嗜中温阳光杆菌（*Heliobacterium modesticaldum*）（细菌）；细胞的大小为 1μm×3μm。（b）坎氏甲烷火菌（*Methanopyrus kandleri*）（古生菌）。细胞大小为 0.5μm×4μm [Rachel R and Stetter K O，1981. *Archives of Microbiology* 128：288～293. Springer-Verlag Gmb H&Co. KG]。（c）酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）（真核）；细胞直径为 8μm。

一般而言，微生物细胞非常小，尤其是原核细胞。例如，杆状的原核生物一般长度为 1～5μm，宽约 1μm，因此肉眼是观察不到的。细菌非常微小，一个“句点”中就能够容纳 500 个长度为 1μm 的细菌。真核细胞一般比原核细胞大，但真核细胞的大小相差也很远，直径从 3μm 到几百微米（也见第 4 章）。中会再次提及细胞的大小。

病毒

病毒是微生物的主要类群（图 2.3），它不具有细胞结构并缺少细胞的很多特性，特别是它们不是动态的开放系统，不能吸收养分和排出废物。病毒粒子是非常稳定的静态结构，它的每一部分都不能被取代。只有在侵染细胞时，它才获得了生命系统的主要特征——复制。与细胞不同，病毒本身没有代谢能力。尽管它含有自己的基因组，却缺乏核糖体，必须依赖于宿主的细胞合成机器来合成自身的蛋白质。

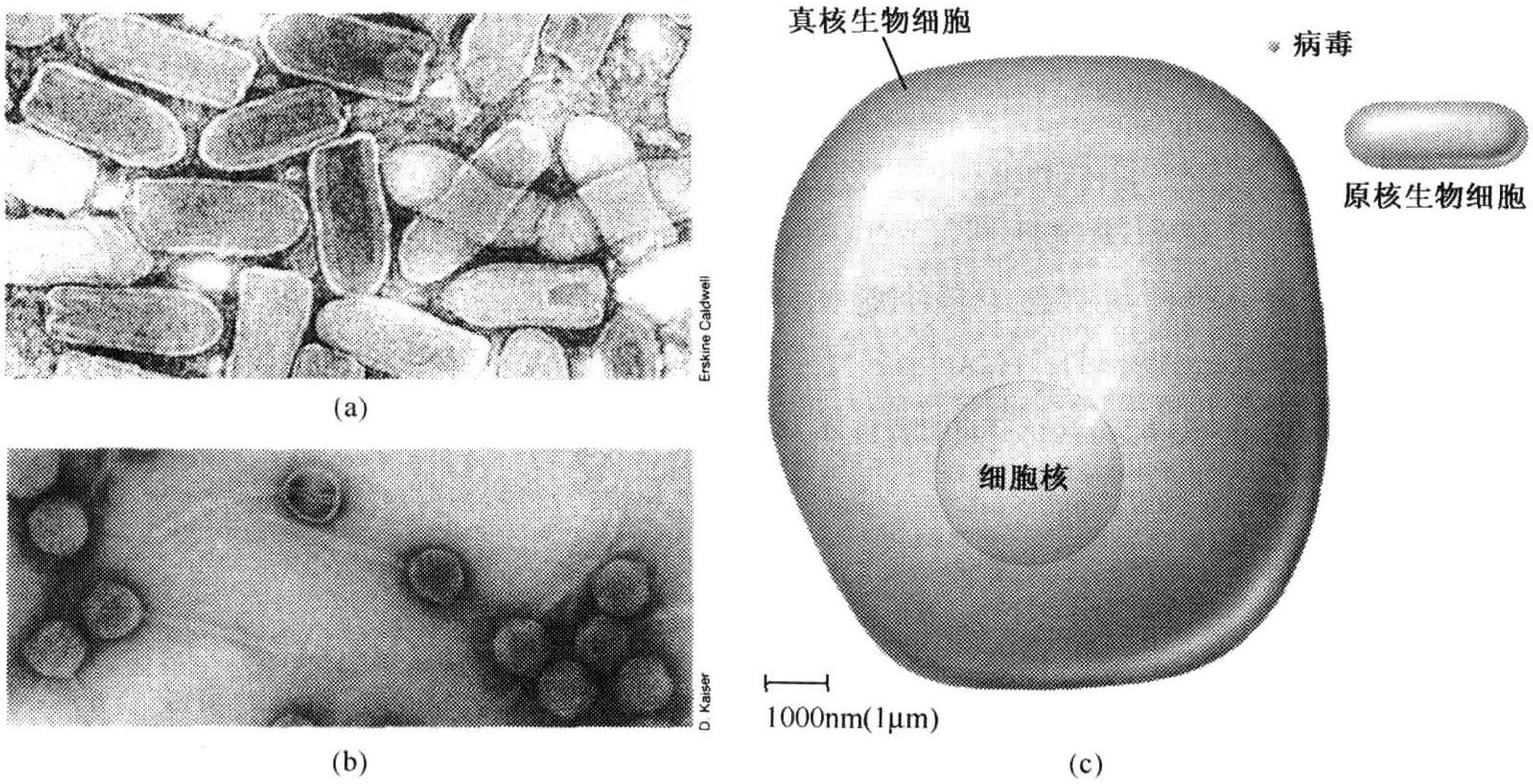


图 2.3 病毒结构及病毒与细胞的大小比较。(a) 杆状病毒粒子（一种真核生物病毒），单个病毒的直径为 65nm。(b) 细菌病毒（λ 噬菌体），每个病毒粒子头部的直径为 65nm。(c) 是 (a) 图和 (b) 图中病毒的大小及与真核和原核细胞的比较。

病毒能感染所有细胞，包括微生物细胞。许多病毒能使其侵染的生物致病。病毒的侵染会对细胞产生重要影响，包括增强细胞生存能力的遗传变化。病毒比细胞小得多，甚至比原核细胞都小得多（图 2.3），最小的病毒直径只有约 10nm。

概念检查

所有微生物都具有一些基本相同的结构，如细胞质膜、核糖体和细胞壁。有两种类型细胞结构：原核细胞和真核细胞。病毒不是细胞但依靠细胞进行复制。

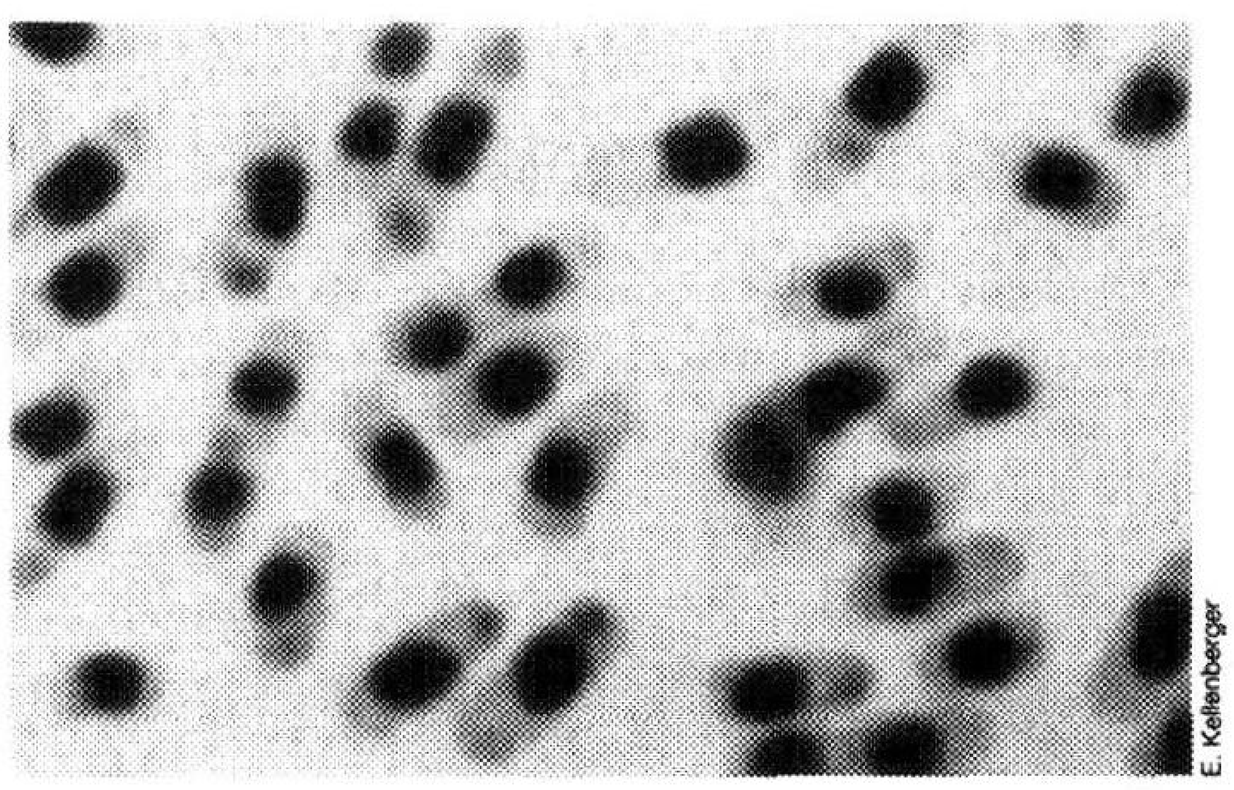
- 如何通过观察细胞的内部结构区分是真核细胞还是原核细胞？
- 核糖体在细胞中起何重要作用？
- 典型的杆状细胞的长度是多少？你比此细胞大多少？

2.2 微生物细胞中 DNA 的排列

细胞的所有生命活动都是由它们的基因组（genome）控制。基因可以定义为 DNA 的一部分，能编码蛋白质（通过 mRNA）和其他 RNA 分子（如 rRNA 或 tRNA）。第 15 章将讨论有关测定和分析从细菌到人类基因组方面的研究进展。这些研究进展已经产生了几百种不同生物的详细基因蓝图，使人们能对生物进行比较。这里仅介绍一下真核生物和原核生物细胞中基因组的组织形式。

细胞核和拟核

原核生物和真核生物的细胞结构有不同的组织形式。在原核细胞中，DNA 是以一个叫做细菌染色体的大的双链分子形式存在。染色体聚集成一个可见的结构称为拟核（nucleoid）（图 2.4）。第 7 章会看到大多数原核生物的 DNA 是环形的。多数原核生物只有一个染色体。正因为如此，每个基因一般只有一个拷贝，并且都是单倍体（haploid）。许多原核生物还含有少数几个染色体外环状 DNA 称为质粒（plasmid）。质粒上的基因通常赋予细胞一些特殊功能（如特殊的代谢特征），这与维持细胞生存所必需的并且位于染色体上的基因不同。



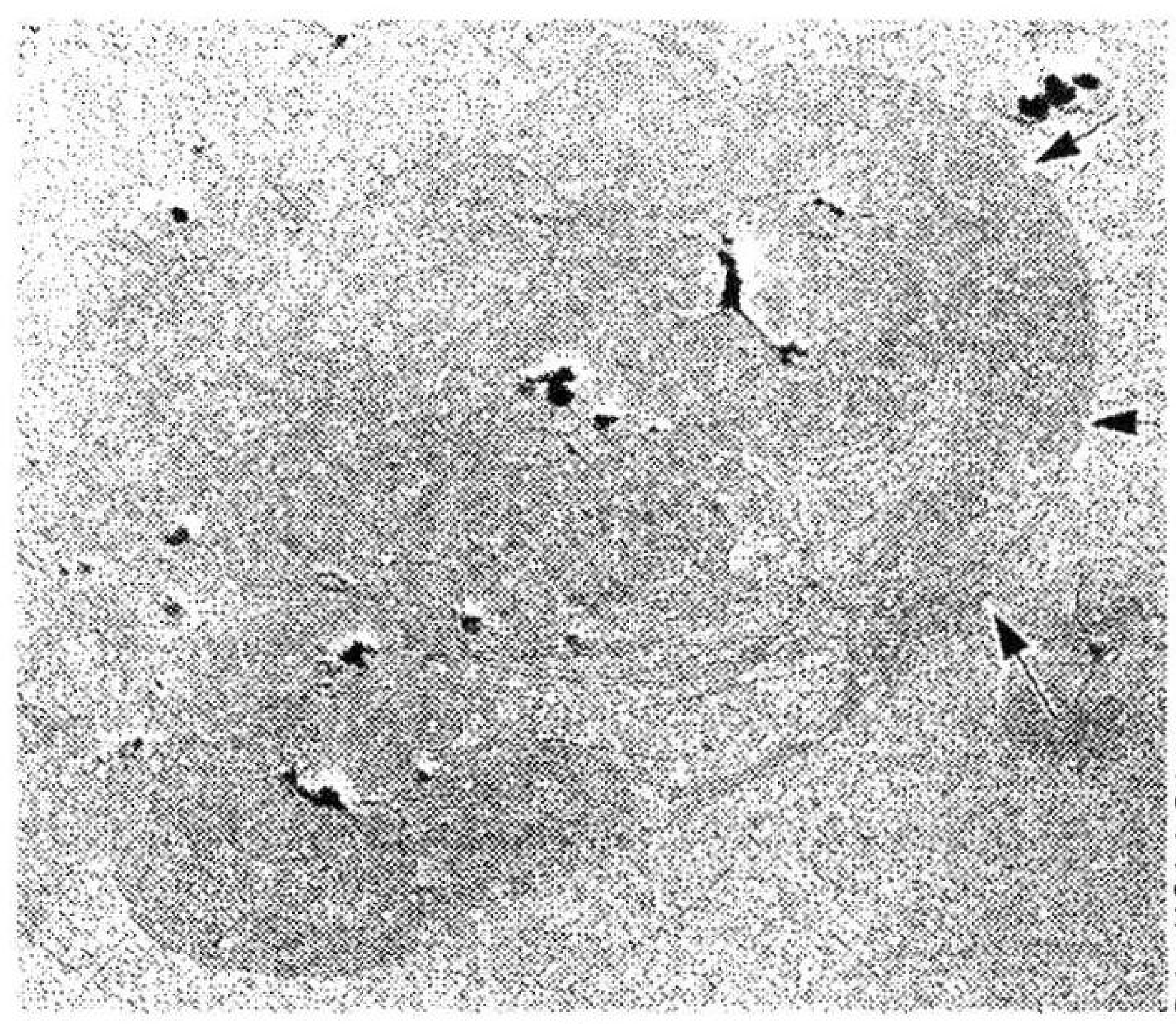


图 2.4　拟核。（a）通过特殊方式处理后看到的大肠杆菌细胞中的拟核。单个细胞长度约为 3μm。（b）从大肠杆菌释放出的拟核的电镜照片。通过温和裂解的方式使高度紧凑的拟核保持完整并释放出来。箭头指的是 DNA 链边缘。

真核细胞中，DNA 以线性方式存在于细胞核内，经高度压缩分布在染色体上（chromosome）。不同生物具有不同数量的染色体。例如，酿酒酵母有 16 条染色体，排列成 8 对，而人类细胞中有 46 条（23 对）染色体。真核生物的染色体不仅含有 DNA，还包括 DNA 折叠和压缩所必需的蛋白质及基因表达所必需的其他蛋白质。真核生物和原核生物的一个关键区别是真核生物一般都包含两个拷贝的基因，因此它们多数为二倍体。真核细胞的分裂过程中细胞核在减数分裂（mitosis）过程中发生分裂（图 2.5），产生了两个姐妹细胞，各自接受了一整套基因。

真核细胞的二倍体基因组在减数分裂过程中被分成两部分，成为单倍体的配子用于

有性生殖。合子形成过程中两个配子的融合使细胞恢复了二倍体状态（详见第 14 章)。

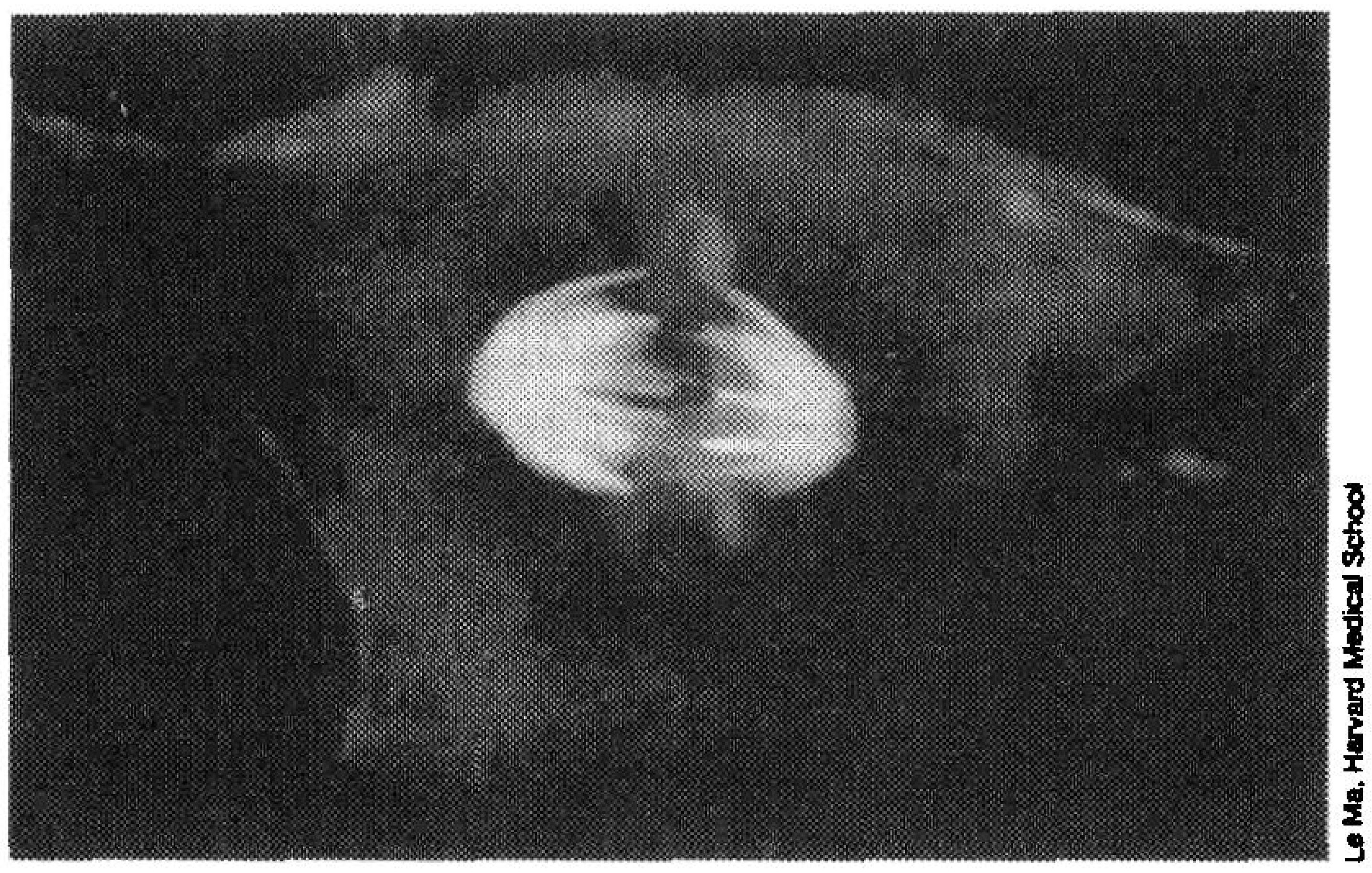


图 2.5 袋鼠细胞的有丝分裂。照片是在细胞有丝分裂的中期拍摄的。绿色部分表示一种在推动染色体分离过程中的重要蛋白——微管蛋白（见 14.5 节)。蓝色部分是染色的 DNA，表示出了染色体。尽管有丝分裂在真核细胞中是整个细胞周期的一个部分，但原核细胞没有有丝分裂。

基因、基因组和蛋白质

一个细胞中有多少个基因和蛋白质？像大肠杆菌这样的典型细菌，其单个环形染色体上含有 4.68×10^6 bp DNA。由于完成了大肠杆菌（*Escherichia coli*）基因组的全部测序，我们知道它含有大约 4300 个基因。一些细菌的基因组所含的基因大约是大肠杆菌的 3 倍，而另外一些则只有这个数目的 1/8。真核细胞基因组一般比原核生物的大。例如，人类细胞的 DNA 是大肠杆菌的 1000 倍，所含的基因是大肠杆菌的 7 倍（后面将会看到真核生物的大多数 DNA 是不编码蛋白质的)。

单个大肠杆菌细胞中含有约 1900 种不同的蛋白质和 240 万个总蛋白质分子（表 3.2)。一些蛋白质在大肠杆菌中含量很高，有些含量适中，而另外一些蛋白质则只含有一个或者几个拷贝。因此，大肠杆菌控制基因表达的机制，并不能使所有的基因都能同等程度地进行表达（图 1.4）或者同时表达。这在所有的细胞中都是一种普遍现象，我们将在第 8 章中涉及基因表达的主要调控机制。

概念检查

基因控制蛋白质的特性，细胞中所有基因的总合叫做基因组。细胞中的 DNA 形成染色体。原核生物细胞中通常只有一个环形染色体，而真核生物细胞中还存在着一些线性染色体。

- 细胞核与拟核有何区别？
- 质粒和染色体有何区别？
- 为什么人体细胞中含有的基因比细菌细胞的多？

2.3 生命进化树

进化（evolution）是随着时间的推移，遗传上的改变导致了在一个种类中新种或变种产生的过程。是细胞的结构决定了进化么？"是"或者"不是"都有可能。研究各种生命形式之间的进化关系是系统发育学（phylogeny）的主题。一方面可以认为所有已知的原核细胞与真核细胞在系统发育是截然不同的；另一方面，并非所有的原核细胞在进化关系上都非常的接近。真细菌和古生菌本身在进化关系上有很大区别。

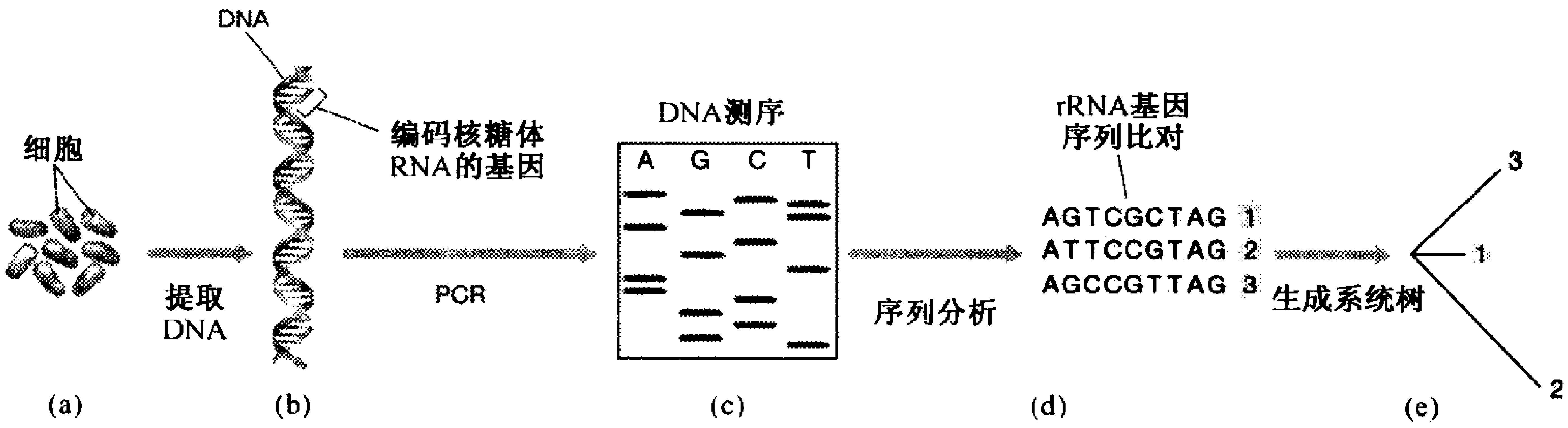


图 2.6 核糖体 RNA（rRNA）基因测序和系统树。（a）破碎来自纯培养或者环境的样品细胞。（b）分离 rRNA 基因并用 PCR（见 7.9 节）扩增得到很多拷贝。（c）对基因测序（见 10.13 节）。（d）将得到的序列用计算机进行比对。采用一定的算法两两之间比较，则产生能够说明被分析的生物之间的 rRNA 序列之间差别的系统树。（e）表示所分析的有机体 rRNA 序列的差异。在所表示的例子中，序列差异如下：有机体 1 对 2 有 3 个差异，1 对 3 有 2 个差异，2 对 3 有 4 个差异。因此 1 和 3 的关系比 2 和 3 及 1 和 2 的关系更近。如果采用的样品来自自然环境，在复制和测序之前必须对分离自不同微生物的 rRNA 进行筛选（详见第 11.5 节和第 18.5 节）。

可以通过比较某些大分子物质的序列推断系统进化关系。具体原理将在第 11 章中讨论，构成核糖体的大分子物质尤其是核糖体 RNA 是确定进化关系很好的工具。由于所有细胞都包含有此分子，因此已经被用来建立包括原核和真核生物在内的所有生命进化树（图 2.7）。美国微生物学家 Carl Woese 首先以 rRNA 分子作为工具构建系统进化树。

图 2.6 是以 RNA 为基础的构建进化树的步骤。简而言之，就是对不同生物的 RNA 序列进行测定然后在计算机中将这些序列进行比对和审查。生物体之间的 rRNA 序列相差越多，它们之间的进化关系就越远。进化关系的远近以系统树的方式表现出来。

三个生物域

通过比较 rRNA 序列将细胞鉴定为三个不同的进化谱系，其中两个包含原核细胞，而另外一个由真核细胞构成。这三个谱系也叫做域（domain），分别是真细菌域（*Bacteria*）、古生菌域（*Archaea*）和真核生物域（*Eukarya*）（图 2.7），人们认为这些谱系是由一个共同祖先或者是地球上的早期生物群体分化而来的（见 11.7 节）。

生命树不仅说明所有原核生物在进化关系上非常接近，它还揭示了另外一个重要的事实：古生菌域比真细菌域更接近于真核生物域，因此共同祖先的分化开始就朝着两个

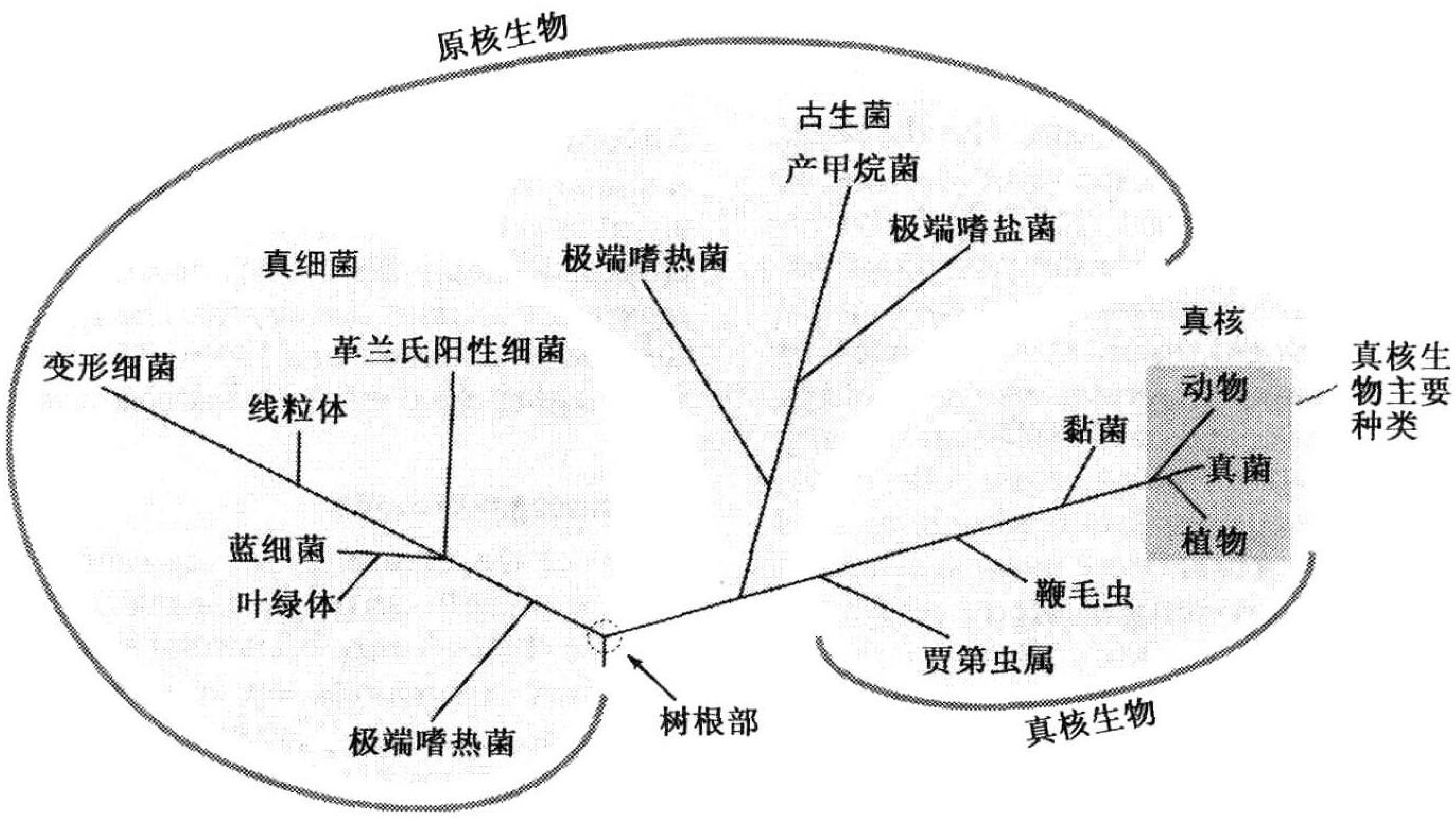


图 2.7 通过比较 rRNA 确定的生命进化树。进化树包括了三个域：真细菌域、古生菌域（原核生物）和真核域（真核生物），每个域只表示出了几种类型。每个域的详细进化树可以在图 2.9、图 2.18 和图 2.22 中看到，系统树可以在第 11～14 章中看到。超嗜热菌是生长在温度高于 80℃的原核生物。红色阴影的部分是大生物，生命树上的其他生物是微生物。

方向发展，即真细菌和第二个主要分支。第二个分支最终分化为古生菌域和真核生物域（图 2.7）。

真核域

由于高等动物和植物细胞都是真核的，因此人们认为真核微生物是多细胞有机体的祖先，生命树支持这种说法。正如人们所预期的那样，微小的真核生物很早就从真核谱系上分支，而植物和动物在靠近顶点的地方才分支（图 2.7）。但是，分子测序及其他的一些证据表明真核细胞含有两种不同域的细胞。除了细胞核染色体上的基因组外，真核生物细胞的线粒体和叶绿体都含有它们自己的基因组（DNA 是以环状形式存在，如真细菌）和核糖体。rRNA 测序技术（图 2.6）证明这些细胞器都来自于特定的细菌谱系（图 2.7）。因此，线粒体和叶绿体都曾经是游离的细胞，出于保护自身或者其他原因，才在真核细胞中定居下来。形成这种稳定关系的过程叫做内共生，这将在后面的章节中讨论（见 11.3 节和 14.4 节）。

分子测序技术对微生物学的贡献

分子系统发育揭示了所有细胞之间的进化关系。同样重要的是，这种技术已经产生了原核生物的进化框架，而这一框架在微生物学建立以前是没有的。除此之外，以 RNA 为基础的系统发育还创建了一些新技术，它们对微生物学的很多分支学科都产生了影响。这些领域包括微生物分类学、微生物系统学和临床诊断学。在这些领域中，分子系统学帮助我们认识了细菌的种类，能够使人们不用培养就能鉴定出某些临床微生

物。后面的几章中将涉及这些内容（见11.18节和24章）。

概念检查

通过比较rRNA序列已经确定了三个生物域：真细菌域、古生菌域和真核生物域。分子测序还说明真核生物的大多数细胞器在细菌中都有进化的根源，并且已经产生了一些用于微生物生态学和临床微生物学研究的新工具。

◆ 真细菌域和古生菌域是如何分化的？在哪些方面相似？

◆ 哪些分子证据可以证明内共生理论？

Ⅱ 微生物多样性

进化塑造了地球上的所有生命。我们今天看到的微生物细胞多样性是近40亿年进化的结果。可以从多方面理解微生物多样性。例如，细胞大小、细胞形态（形状）（cell morphology）、代谢类型（生理学）、运动性、细胞的分裂机制、致病性、发育生物学、对极端环境的适应和细胞生物学的其他方面。综合考虑，微生物的多样性非常巨大。每年新的研究都会揭示出更多的微生物种类，将在本书中涉及这些。

在接下来的几节中将描述微生物多样性。在第12～15章也将详细讨论这一内容。本章将简短地介绍代谢多样性，作为微生物多样性的开端。微生物多样性和代谢多样性之间的联系非常紧密。微生物利用所能想到的合乎化学和物理法则的方式来制造生命。如此惊人的代谢能力使微生物能在新的环境下生存。由此又促进了遗传的分化。将在第5、6、17章中详细介绍代谢多样性。

2.4 微生物生理的多样性

所有的细胞都需要能量及获得能量的方式。也需要遗传机制保证它们的复制和对变化的生活环境的适应。这些都是高度需氧的过程，因此能量来源对于细胞非常重要。可以通过三种方式获得能量，图2.8概括了这三种选择：有机化合物、无机化合物和光。

化能有机营养生物

地球上有非常多的有机化合物可以被众多微生物所利用以获得能量。所有天然化合物和几乎大多数合成化合物都可以被一种或者几种微生物降解。微生物在氧化这些化合物的过程中获得能量并将能量储存在高能化合物ATP（adenosine triphosphate）中（图2.8）。一些微生物只能在氧气存在的情况下才能从化合物中提取能量，这些微生物叫做需氧生物（aerobe）。另外一些微生物在提取能量的过程中不需要氧气，这些微生物叫做厌氧生物（anaerobe）。还有一些微生物在有氧和无氧的条件下都能使有机化合物降解。从有机化合物中获得能量的微生物叫做化能有机营养生物（chemoorganotroph）（图2.8），大多数可以培养的微生物都是化能有机营养生物。

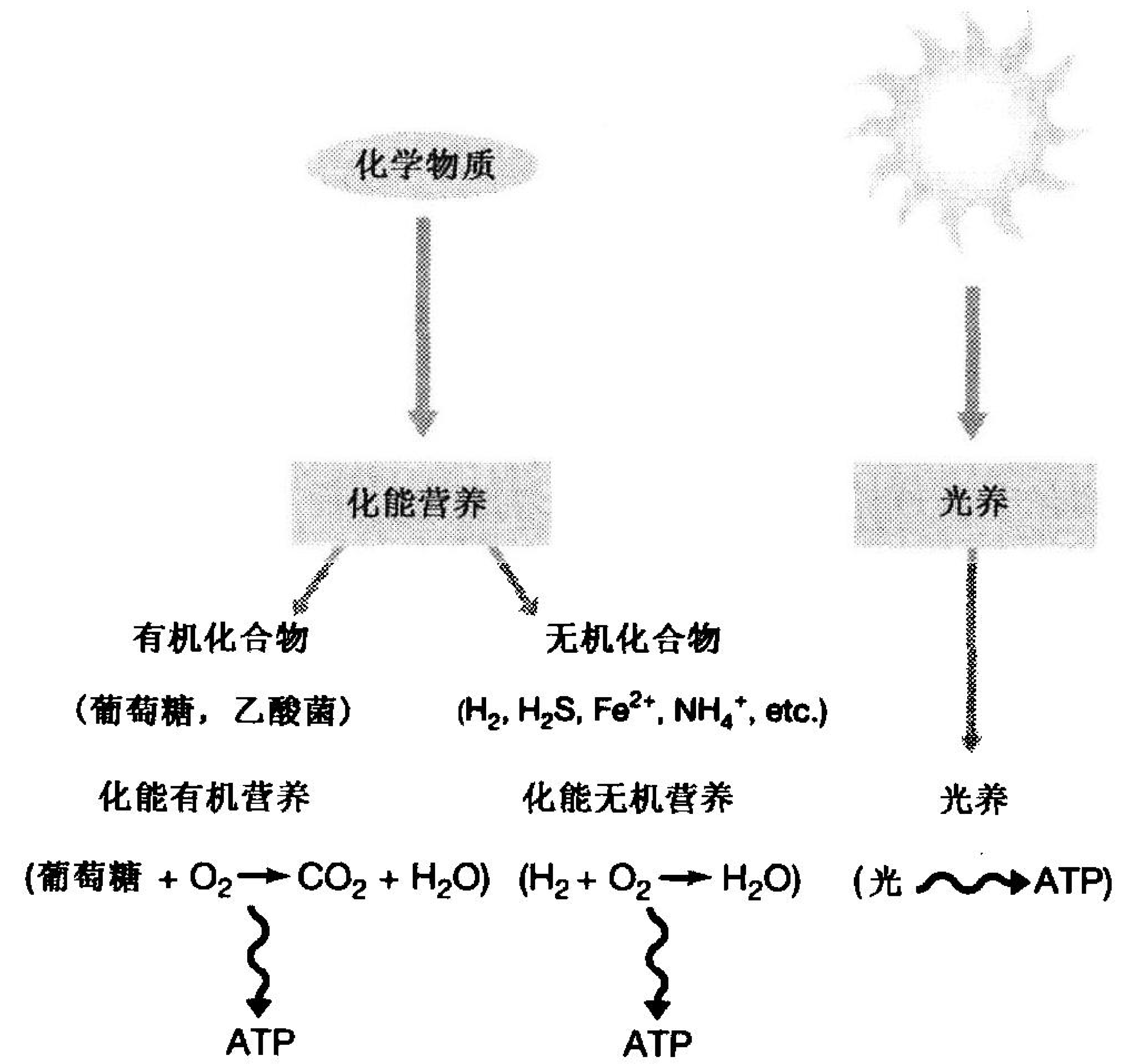


图 2.8　获得能量的几种选择。这里所列举的有机物和无机物只是被化能营养生物所利用的物质中的少数几种。化能营养生物将这些有机和无机化合物氧化产生 ATP，而光养生物则是将太阳能转化为化学能（同样以 ATP 的形式）。

化能无机营养生物

有些原核生物能利用无机化合物获取可利用的能量，这种代谢方式叫做化能无机营养（chemolithotrophy）（由威诺格拉德斯基发现，见 1.7 节），采用这种方式代谢的微生物叫做化能无机营养生物（chemolithotroph）（图 2.8）。这种产能方式只在原核生物中发现，广泛分布在真细菌域和古生菌域中。所用到的无机化合物的范围很广泛，但是作为一种规律，某种特定的原核生物只优先利用一种或者一组相关的化合物。

很明显，从无机化合物中获取能量有很多优点。它们不会与化能有机营养生物竞争。除此之外，实际上许多被氧化的无机化合物，如 H_2和 H_2S 都是化能有机营养生物的废弃物。因此，化能无机营养生物已经进化出了大多数有机体都无法使用的能源开发策略。

光养生物

光养微生物含有色素，它们可以利用光能，因此它们的细胞是有颜色的（图 2.10a)。与化能营养生物不同，光养生物（phototroph）不需要化学物质作为能源，制备 ATP 的能量来自光。这显然有很大的优势，不存在与化能营养生物竞争能量的问题，在各种不同的微生物生境中均能得到阳光。

在原核生物中有两种主要的光能营养方式。一种叫做生氧光合作用（oxygenic photosynthesis），氧气被释放出来，这是蓝细菌及其亲缘关系很近的种的特征。另外一种

形式叫做不生氧光合作用（anoxygenic photosynthesis），存在于紫色和绿色细菌中，不会导致氧气的释放。这两种光养类群都利用光能制造 ATP。在合成 ATP 的机制方面具有惊人的相似性。实际上，生氧光合作用的进化根源存在于更为简单的无氧过程中（详见第 17 章）。

异养生物和自养生物

所有的细胞都需要碳元素作为主要营养物。微生物细胞或者是异养生物（heterotroph）的，即需要一种或者多种有机化合物作为它们的碳源，或者是自养生物（autotroph）的，即以二氧化碳作为碳源。化能有机营养很明显是异养生物。而许多化能无机营养生物和所有的光养生物都是自养的。自养微生物往往被称为初级生产者（primary producer），因为它们利用二氧化碳合成有机物被自身或者被化能有机营养微生物所利用。后者或者直接以初级生产者为食，或者以它们分泌出的物质为食。地球上所有的有机物都是由初级生产者尤其是由光养生物产生的。

生长环境和极端环境

微生物在地球上无处不在。它们的生活环境包括土壤、水、动物和植物及由人类制造的所有结构。实际上，自然界中的样品很难是无菌状态（不存在任何生命形式）。

一些环境是人类认为非常极端的环境。尽管这些环境对微生物的生存提出了很大的挑战，但很多情况下，极端环境将伴随微生物的生命过程。在极端环境中栖息的微生物叫做嗜极端微生物（extremophiles），这是一群具有显著特色的微生物群体，它们决定了生命的生理化学极限。

嗜极端原核生物广泛存在于各种苛刻的环境，如滚烫的温泉、湖面上的冰、冰川极地海洋、含盐量很高的水体中、pH 低于 0 或者高于 12 的土壤和水中。有趣的是，这

表 2.1　嗜极端生物的分类和举例[a]

极端	名称	种/属	域	生活环境	最小值	最适值	最大值
温度 高温	超嗜热菌	延胡索酸火叶菌 (*Pyrolobus fumarii*)	古生菌	热、海底高温出口	90℃	106℃	113℃[b]
低温	嗜冷菌	气泡极胞菌 (*Polaromonas vacuolata*)	真细菌	冰	0℃	4℃	12℃
pH 低	嗜酸菌	星名氏嗜酸菌属 (*Picrophilus oshimae*)	古生菌	酸性温泉	−0.06	0.7[c]	4
高	嗜碱菌	格氏嗜盐碱杆菌 (*Natronobacterium gregoryi*)	古生菌	苏打湖	8.5	10[d]	12
压力	嗜压微生物	极端嗜压菌 (*Moritella yayanosii*)[e]	真细菌	深海沉积物	500atm*	700atm	>1000atm
盐 (NaCl)	嗜盐菌	盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*)	古生菌	盐场	15%	25%	32%（饱和）

a. 表中所列出的每个种类的生物是到现在为止的数据。
b. 新发现的一种古生菌可以在高于 121℃的环境下很明显地生长。
c. *P. oshimae* 也是一种嗜热菌，最适生长温度为 60℃。
d. *N. gregoryi* 也是一种极端嗜盐菌，生长的最适盐浓度为 20% NaCl。
e. *M. yayanosii* 也是一种嗜冷菌，它生长的最适温度为 4℃。
* 1atm=1.01325×10^5Pa。

些原核生物不仅仅能忍受这样的极端环境，它们还确实需要这些极端环境去生长。这就是我们为什么把它们叫做嗜极端生物的原因。表 2.1 总结了到目前为止记录在册的嗜极端原核生物，并列出了它们的生活环境的种类；我们会在后面的几章（第 6、12、13 章）继续提到这些微生物。

概念检查

细胞都需要碳源和能量。化能有机营养、化能无机营养和光养生物是指那些分别以有机化合物、无机化合物和光作为能量来源的生物。自养型微生物用二氧化碳作为碳源，而异养型微生物以有机碳作为碳源。嗜极端生物在高等生物无法生活的环境中生存。

◆ 在显微镜下如何区分光养微生物和化能营养微生物?

◆ 什么是嗜极端生物?

2.5 原核生物的多样性

正如我们所看到的那样，原核生物被分成两个不同的种类：古生菌和真细菌（图 2.7）。本节中我们将探究进化树并简单描述在这里发现的一些主要有机体。因为对于微生物学的初学者而言比较熟悉的是细菌域中的一些微生物，因此就从细菌开始。

细菌域

细菌域包含了大量不同种类的原核生物。所有已知的致病原核微生物都是细菌，还有很多种非致病种类。除此之外，这一域还具有形态和生理多样性。其中变形菌门（Proteobacteria）是细菌的最大分支［称为门（phylum)］（图 2.9），变形菌门包括很多化能有机营养型的微生物，如大肠杆菌，它是微生物生理、生物化学和分子生物学的模式生物。还有一些光养的（图 2.10a）和化能无机营养（图 2.10b）的种也属于变形菌门。很多化能无机营养的微生物在代谢过程中利用 H_2S 产生硫元素并储存在细胞内部或者外部（图 2.10b），作为 H_2S 的氧化产物，硫还能被进一步氧化为硫酸根离子。硫化物及硫的氧化可以为一些重要的代谢过程，如二氧化碳的固定或者为能量的产生提供燃料（图 2.8）。

变形菌门包括一些常见的土壤和水微生物、一些生活在植物上或者是以植物为生的微生物和一些能够引起动物病害的微生物。这包括假单胞菌属（*Pseudomonas*）的几个不同的种，其中很多种都能够降解复杂或者有毒性的天然或合成有机化合物，也包括了固氮菌属（*Azotobacter*）。还有一些关键的致病菌也属于变形细菌，包括沙门氏菌（*Salmonella*）、立克次氏体（*Richettsia*）、奈瑟（氏）菌属（*Neisseria*）和很多其他的细菌。

一些细菌可以通过革兰氏染色（Gram staining）过程加以区分，这种技术可以将细菌染成阳性或者阴性（细菌染色的特点将会在第 4 章中讨论）。革兰氏阳性谱系（Gram-positive lineage）细菌包括了许多共同起源和细胞壁结构相同的种。这里将介绍

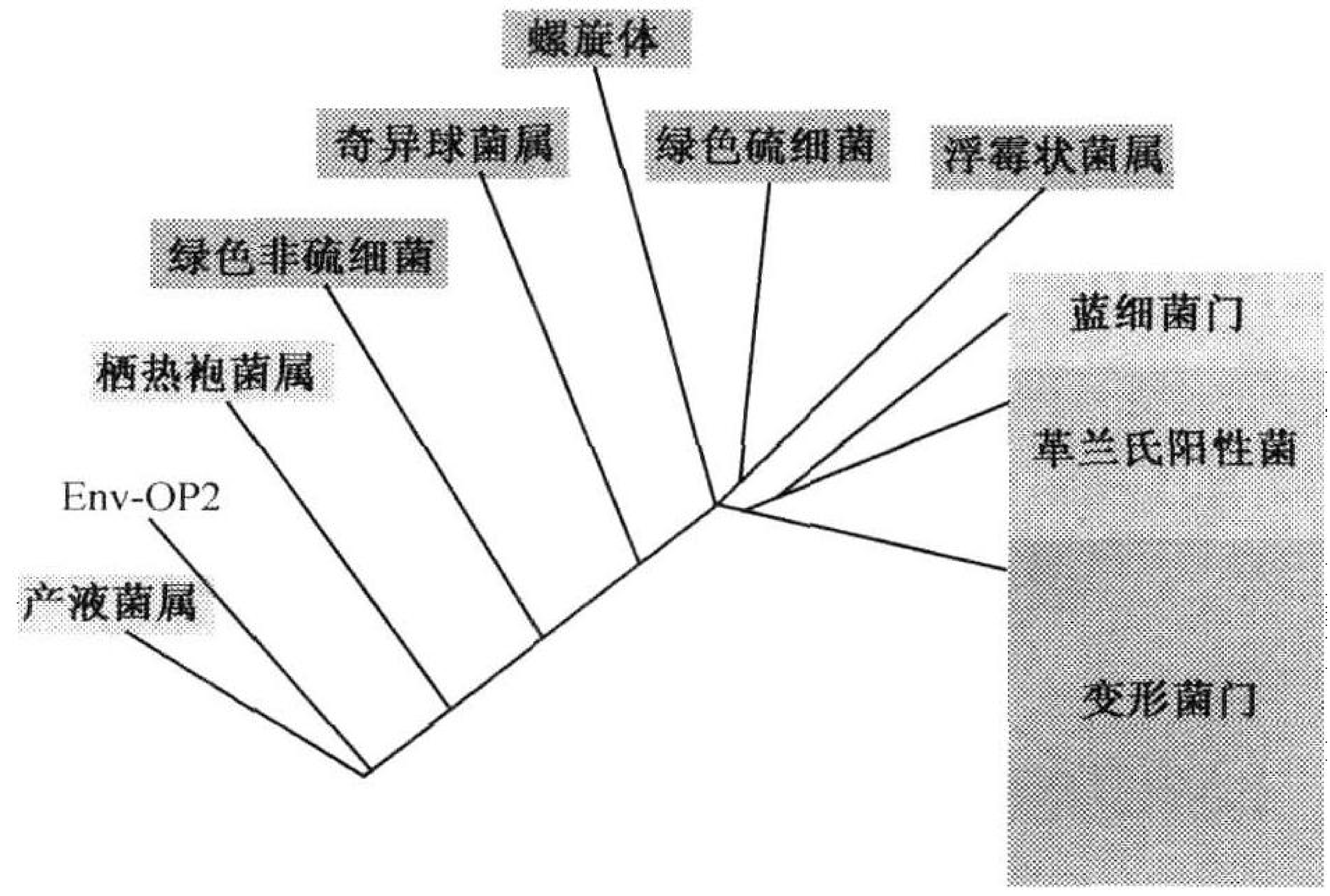


图 2.9　详细的细菌系统进化树。 并非所有已知的细菌都表示在系统树上。彩色盒子的相对大小表示每个类群中已知种属的多少。目前变形菌门是已知的细菌类群中最大的门。系统树上标明 Env [表示"环境"(environmental)] 的谱系不是培养的微生物而是分离自环境生物样品的 rRNA 序列。在这个例子中，与 ENV-OP2 关系最近的为产液菌属（*Aquifex*）。尽管在图中没有表示出来，但是在整个系统树上还有很多其他的这些 Env。

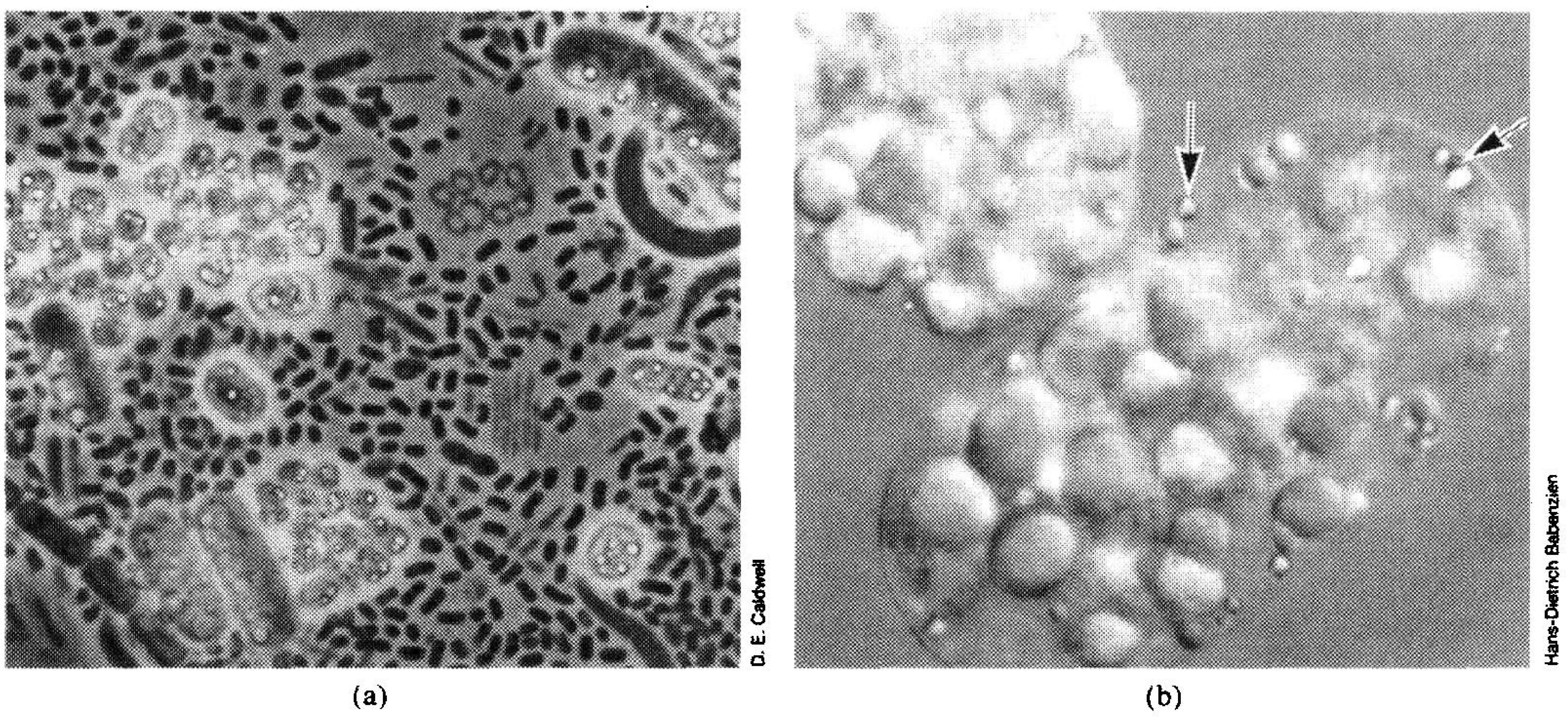


图 2.10　光养和化能无机营养的变形细菌。 (a) 光养的紫色硫细菌，着色菌属（*Chromatium*），(天然微生物群体中的大的红色杆状细胞) 细胞的直径大概为 10μm。(b) 大的化能无机营养硫氧化细菌属于无色菌属（*Achromatium*）。细胞的直径大概为 20μm，在细胞中可以看到形成的硫颗粒（箭头所指）。这两种微生物都能氧化由硫酸盐还原细菌产生的硫化氢。硫酸盐还原细菌是化能有机营养菌，能够氧化有机化合物或者氢气，并能将此过程与硫酸盐的还原过程偶联，完成硫循环（见 19.13 节）。

内生孢子形成菌——芽孢杆菌属（*Bacillus*）（由 Ferdinand Cohn 发现，第 1.5 节）（图 2.11a）和梭菌属（*Clostridium*）及一些相近的原核生物，如产生抗生素的链霉菌属（*Streptomyces*）。乳酸细菌常见于腐朽的植物组织及奶制品上，这类细菌有链球菌属（*Streptococcus*）（图 2.11b）和乳杆菌属（*Lactobacillus*）。其他令人感兴趣的革兰氏阳性菌是支原体属（*Mycoplasma*），这些原核生物缺乏细胞壁，基因组很小，并且通常是

致病菌，具有重要医学价值（见 12.21 节和图 12.62）。

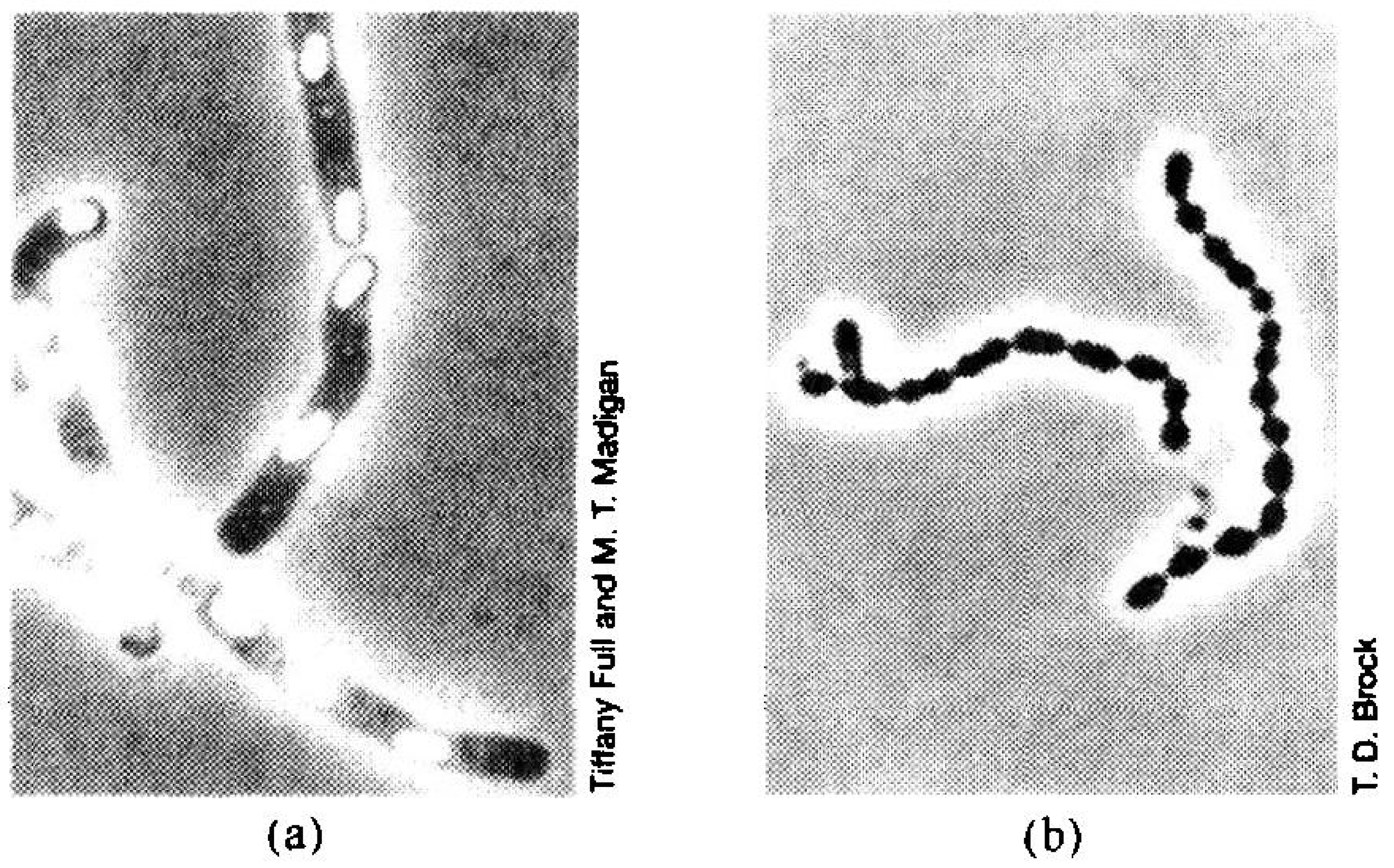


图 2.11 革兰氏阳性菌。（a）杆状内生孢子细菌——芽孢杆菌属（*Bacillus*），这里所表示的细胞以链条状出现。注意细胞内的内生孢子（明亮的折射结构）。内生孢子对热、化学物质和辐射都具有很强的抗性。（b）链球菌属（*Streptococcus*）是以长链形式存在的球形细胞。它广泛存在于奶制品中，某些种类还是潜在的致病菌。

蓝细菌（Cyanobacteria）（图 2.12）是与革兰氏阳性菌近缘的一类生氧光能自养菌（图 2.9）。因为它们是地球上进化出的第一个生氧光能自养微生物，因此在生命进化过程中非常关键（图 1.1b）。在早期没有氧气的地球上，他们产生氧气为原核生物的进化铺平了道路，使其他生物能呼吸氧气。几十亿年后当地球上产生了富含氧气的环境后才产生了高等的有机体，如动物和植物。

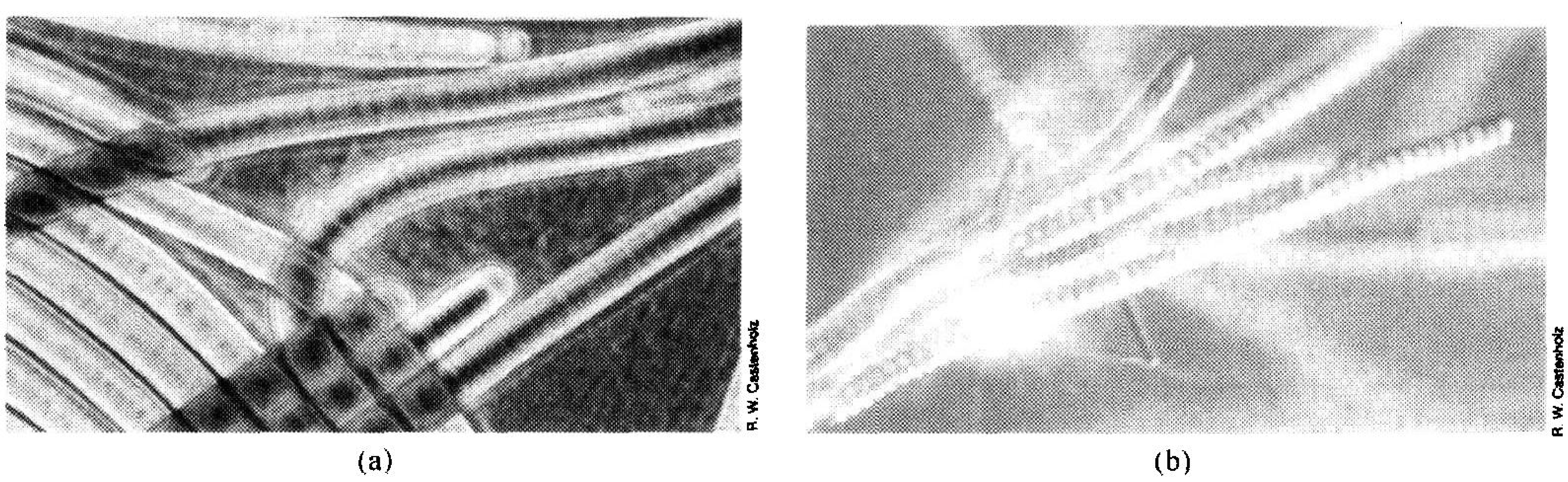


图 2.12 丝状的蓝细菌。（a）颤藻属（*Oscillatoria*）。（b）螺旋藻属（*Spirulina*）。很久以前蓝藻产生了现在地球上的氧气。人们还知道很多其他形状的蓝藻，包括单细胞的、菌落形式的和异形胞（heterocyst）。后者含有称作异形胞的特殊结构负责氮的固定（见 12.25 节和 17.28 节）。

一些细菌的谱系具有特定的形态。水生浮霉状菌属（*Planctomyces*）的细胞呈现明显丝状，使这些微生物能附着在固体基质上（图 2.13），螺旋形的螺旋体属（*Spirochetes*）也类似（图 2.14）。

细菌域的另外两种主要的谱系是光养的：绿色硫细菌（green sulfur bacteria）和绿色非硫细菌［绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）］（图 2.15）。这两个谱系具有相似的色素，能以自养的形式生长。绿屈挠菌属是一种丝状原核生物，主要栖息在温泉和浅海湾中，在含有多种不同微生物的菌垫（mat）中经常是占优势的个体。绿屈挠菌属也同样因为

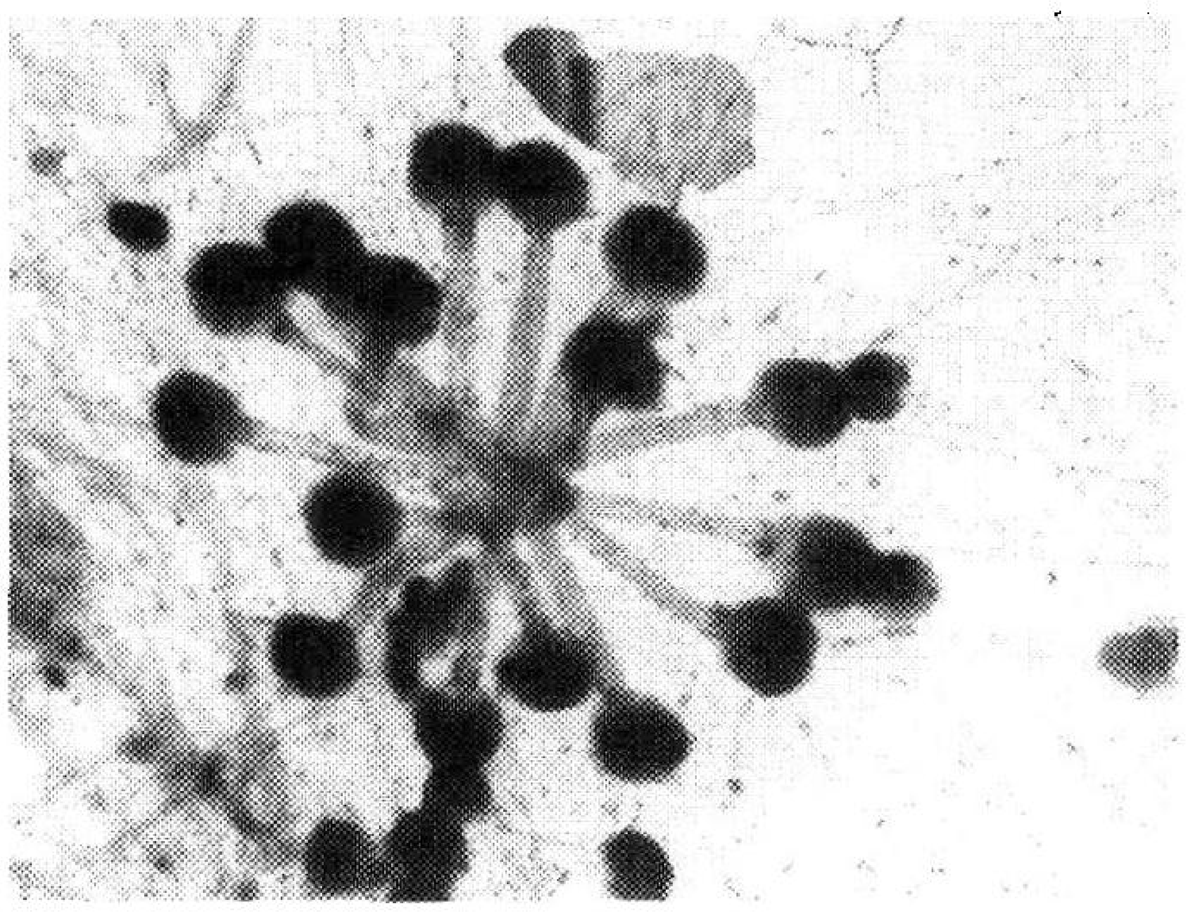


图2.13 一些形态特殊的带柄细菌——浮霉状菌属。图中所示的是一些细胞通过柄形成的蔷薇结。

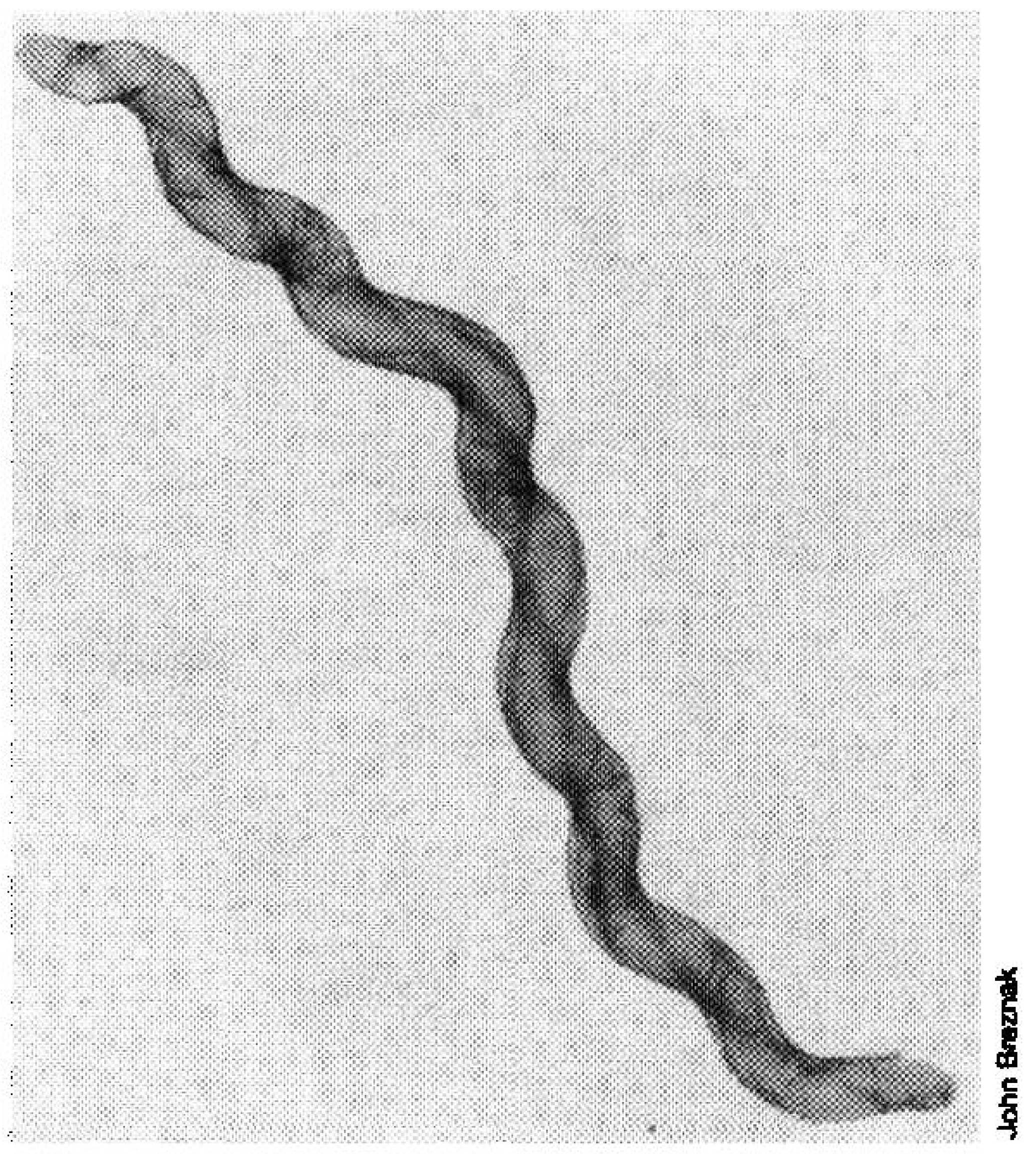


图2.14 螺旋体属朱氏螺旋体（*Spirochaeta zuelzerae*）细胞。这些形态各异的原核生物在进化关系上也各不相同（图2.9）。螺旋藻属在自然界中分布广泛，梅毒和淋巴疾病等病症（见26.12节和27.4节）是由螺旋体引起的。

在光合作用的进化过程中所起的连接作用而引人注目（见12.35节和17.7节）。

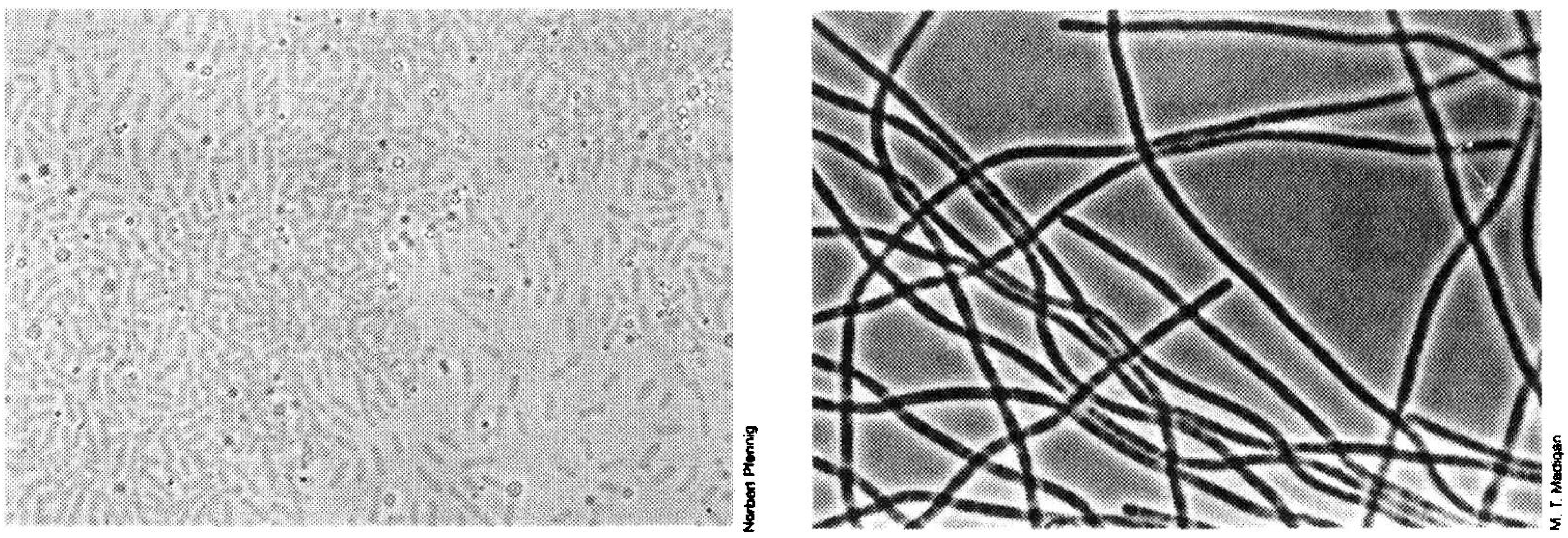


图2.15 绿色细菌的照片。（a）绿菌属（*Chlorobium*）：单细胞宽度约为0.8μm。（b）绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）：丝状物宽度约为1.3μm。尽管具有许多共同特点如色素和膜结构（见17.2节），但是这两种微生物的进化关系距离很远（图2.9）。

其他一些重要的细菌谱系还有衣原体属（*Chlamydia*）和奇异链球属（*Deinococcus*）（图2.9）。衣原体属的大多数种是病原菌，含有很多人类呼吸和性传播病原菌（见12.27节和26.13节）。衣原体是专性细胞内寄生菌（obligate intracellular parasite），这意味着它们生活在高等生物细胞内（在此指人类）。其他一些致病原核生物（如立克次氏体）也是胞内致病菌，立克次氏体属（*Rickettsia*）是变形细菌的一种，能引起如斑疹伤寒和落基山斑疹热，另外一种致病原核生物是结核分枝杆菌（*Mycobacteria tuberculosis*），它是一种能引起结核病的革兰氏阳性菌。这些病原菌在细胞内生存，有利于躲避宿主免疫系统的破坏。

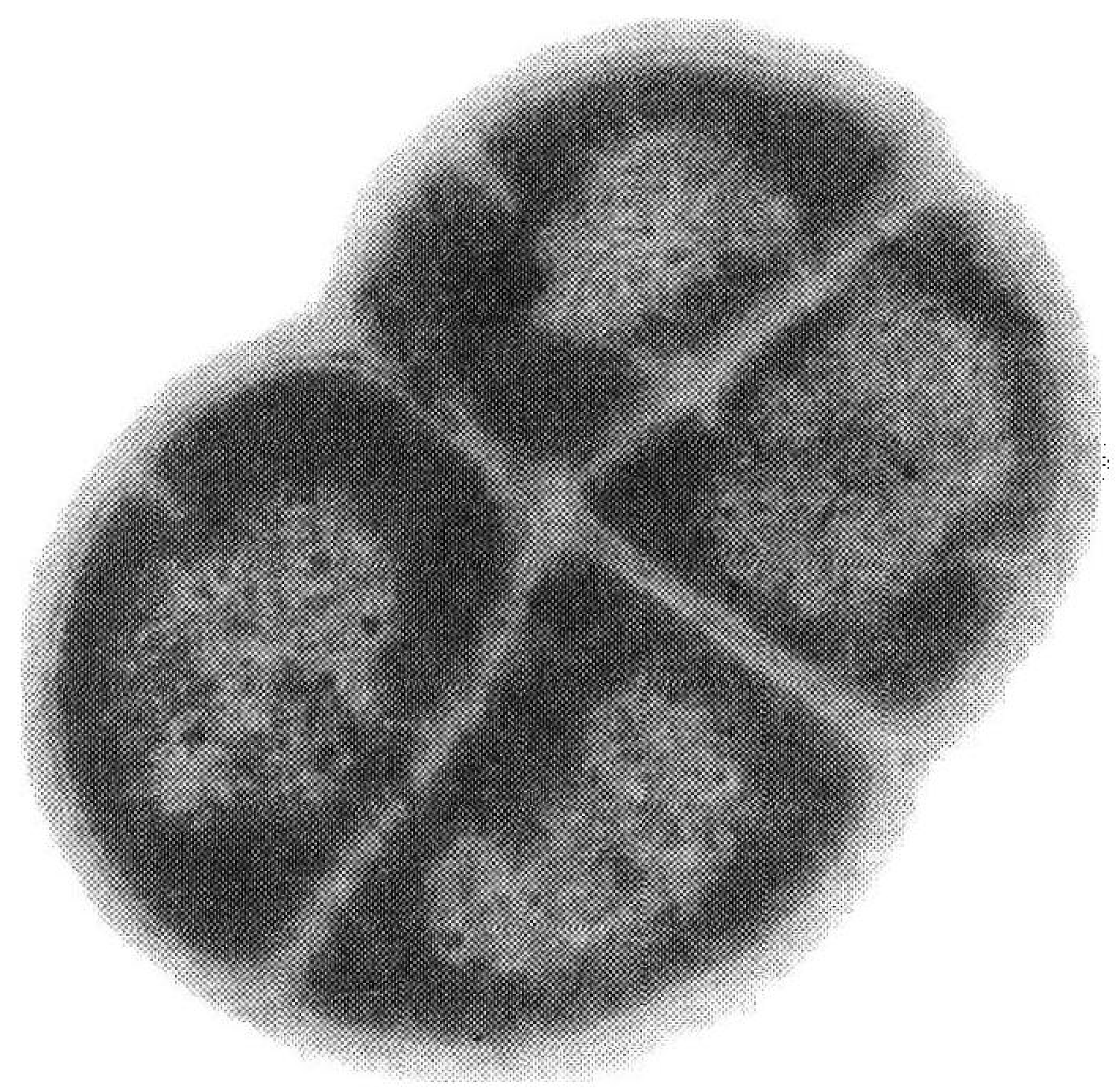


图 2.16　耐放射异常球菌。这种微生物能够经受比致死人类的辐射还高的剂量。详情见 12.34 节。

奇异链球菌属（*Deinococcus*）一些种的细胞壁很特殊，具有对高剂量辐射的天然抗性。耐放射异常球菌（*Deinococcus radiodurans*；图 2.16）是这一类群中的代表种。这种有机体能在高于人类致死剂量很多倍的射线下存活，能使被辐射处理打断的染色体重新组织起来。我们将在第 12.34 节中学习这一令人吃惊的微生物。

最后，还有一些细菌域的谱系位于进化树早期的位置（接近于根部）上分离出来（图 2.9）。尽管这些种群在系统进化上有明显的不同之处，但它们都有一个共同的特点就是能在高温条件下生长［极端嗜热菌（hyperthermophily)］。某些微生物如产液菌属（*Aquifex*；图 2.17）和栖热袍菌属（*Thermotoga*）在接近水沸点的环境中生长，它们的栖息地是温泉。这些谱系（图 2.7 和图 2.9）在进化过程中很早分支的本质与早期地球上的温度比现在高的观念吻合（见 11.1 节）如果最早的生命来自于一个很热的星球，那么与早期生物最接近的物种是极端嗜热菌的看法是合理的。有趣的是，真细菌和古生菌的进化树都表明了这一观点（图 2.9 和图 2.18）。因此这些微生物，如产液菌属、甲烷火菌属（*Methanopyrus*）和火叶菌属（*Pyrolobus*）是非常古老的细胞谱系的现代后裔。

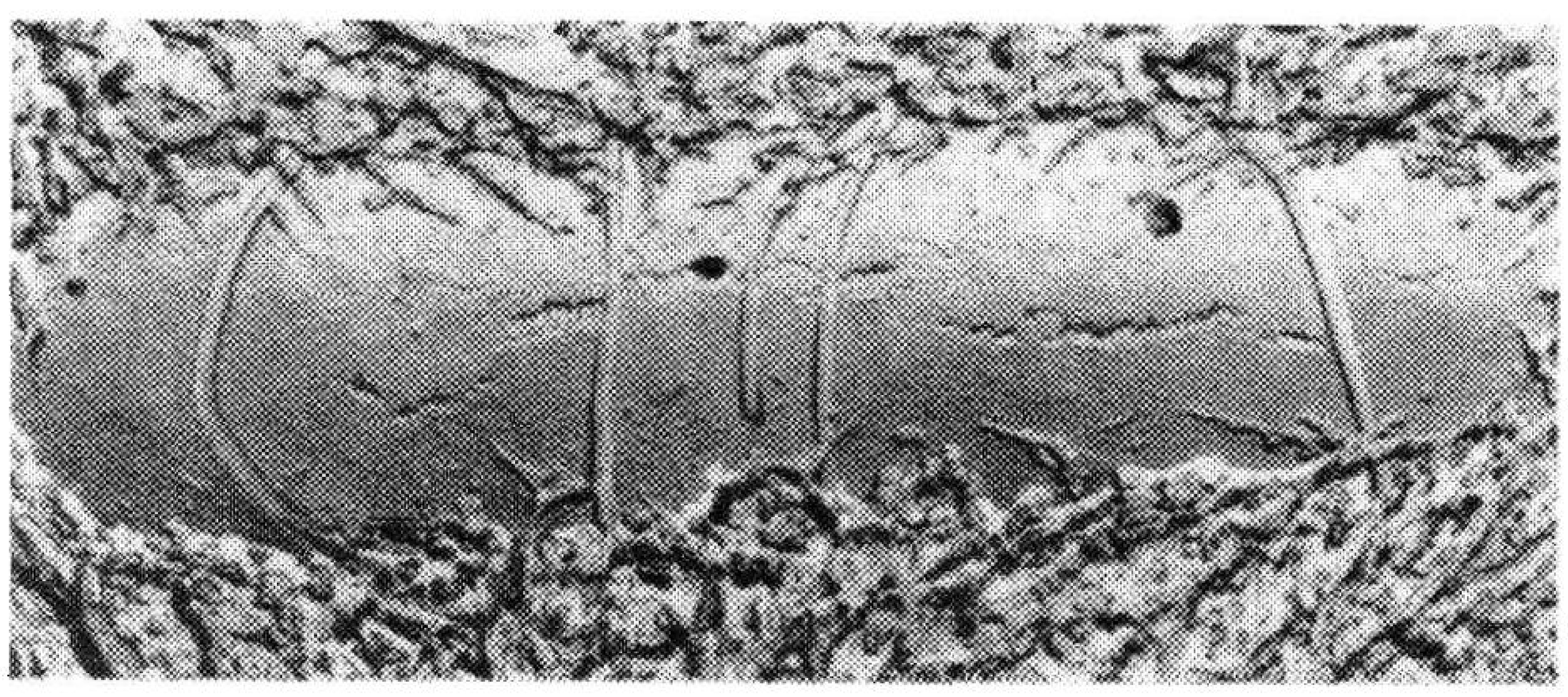


图 2.17　产液菌属。这种早期分支的细菌（图 2.9）是极端嗜热菌，生长的最适温度高于 80℃。

古生菌域

观察古生菌域的进化树可以发现它存在两个分支，即广古生菌门（Euryarchaeota）和泉古生菌门（Crenarchaeota），它们在古生菌域进化树上形成了两个主要分支（图 2.8）。许多古生菌是嗜极端生物，有些能在高温和极端 pH 条件下生存（表 2.1）。例如，火叶菌属（图 2.18 和图 2.19）是所有已知原核生物中最喜欢热的微生物（表 2.1）。

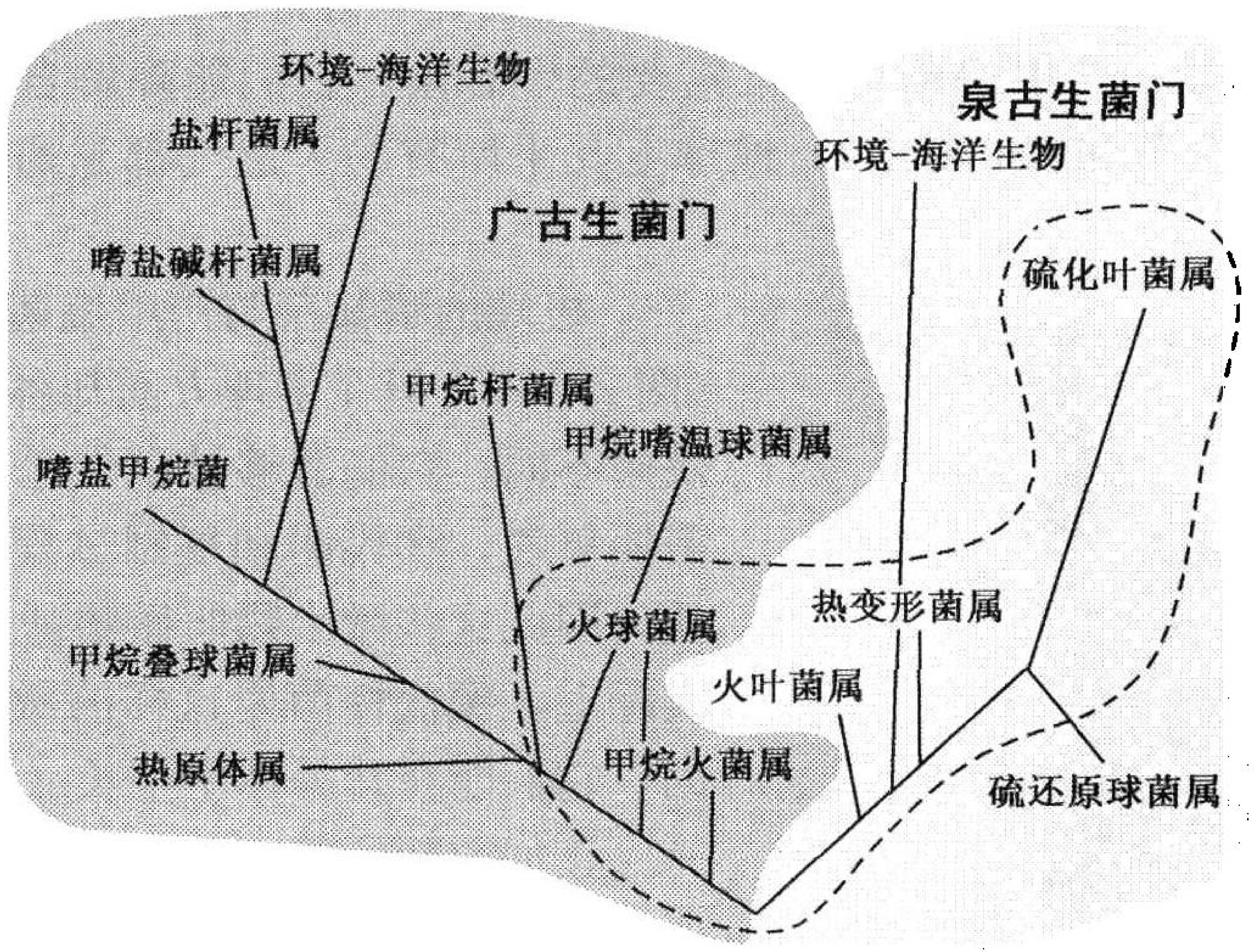


图 2.18 古生菌域详细的系统树。并非所有已知的古生菌类群都在进化树上体现出来。古生菌域有两个主要的亚群——广古生菌门和泉古生菌门。用红线圈起来的是极端嗜热菌，粉红色的为产甲烷菌、极端嗜盐菌及嗜酸菌。每个主要的群都有它们自己的 Env 谱系（见图 2.9 的说明），它们当中的大多数为海洋种类。在古生菌域的两个亚群中有几乎相同数目的种。但古生菌域可培养的种类要比细菌域的少得多。

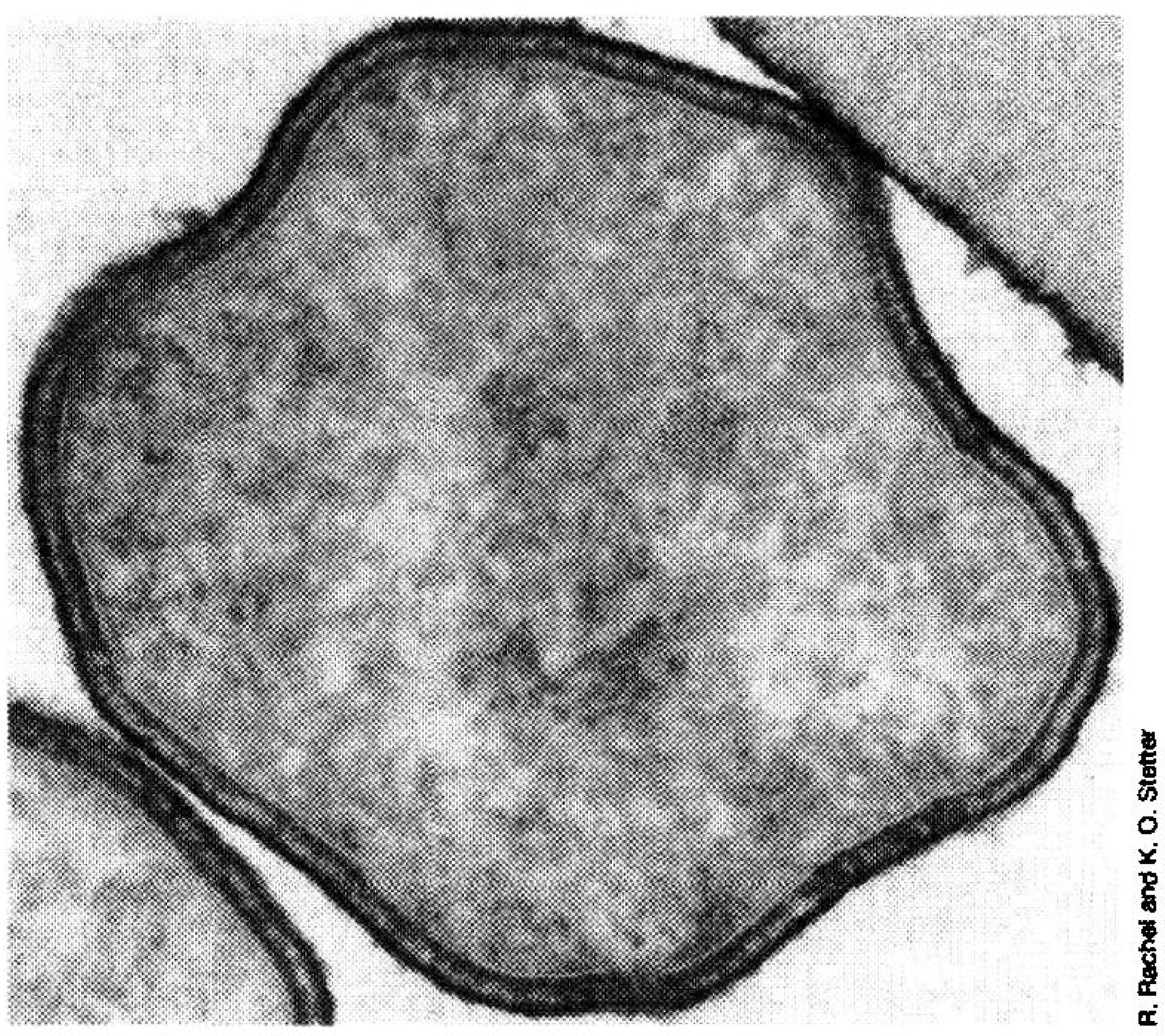


图 2.19 火叶菌属。一种极端嗜热古生菌，居然能在高于水沸点的温度下生长。

尽管盐杆菌属（*Halobacterium*）可以利用光能产生 ATP（与光合作用的方式不同），所有的古生菌（*Archaea*）都是化能营养的微生物。有些古生菌在它们的能量代谢过程中利用有机化合物。还有很多其他古生菌是化能无机营养种类，氢气被作为广泛的能量来源（图 2.8），化能无机营养方式在极端嗜热古生菌中分布特别广泛。

广古生菌门分支包括三个有显著不同生理特性的群（图 2.18）。有些种需要氧气而另外一些则会被氧气杀死，某些种在很高或者很低 pH 环境中生长（表 2.1）。产甲烷

菌如甲烷细菌是严格的厌氧微生物，它们的代谢过程非常特殊，因为能量是通过产生高能物质——甲烷获得。产甲烷菌是非常重要的生态菌，它们能降解自然界中的有机物（见 13.4 节、17.17 节和 19.10 节），地球上几乎所有的天然气都是通过它们的代谢过程积累的。

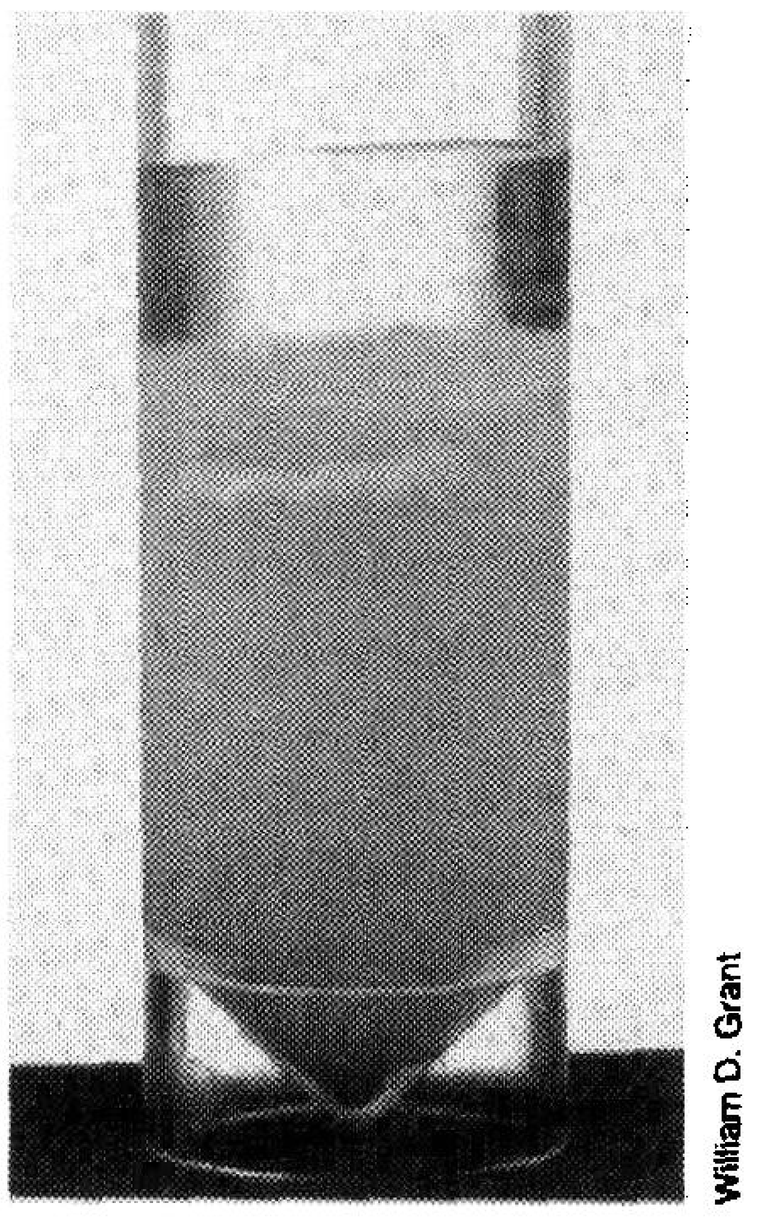


图 2.20　极端嗜盐古生菌。一瓶处于 NaCl 盐析点的盐溶液，里面含有极端嗜盐菌——盐杆菌属。有机体含有色素能吸收能量合成 ATP。它还能在盐晶体中生存。（知识窗，第 4 章，内生孢子可以存活多久?）

极端的嗜盐菌与产甲烷菌的关系非常紧密（图 2.18），但在生理方面却各不相同。与产甲烷菌不同，它们能够被氧气杀死，极端嗜盐菌需要氧气，在代谢和复制过程中都需要大量的盐，因此这些微生物叫做嗜盐菌（halophiles）。实际上，像盐杆菌属这样的微生物是非常喜盐的，它们能在盐晶体中生长（图 2.20）。

正如前面的第 2.4 节中提到的那样，很多原核生物是光养型的，能利用光能产生 ATP。尽管盐杆菌属不产生真正的叶绿素，但却含有能够吸收光能和刺激 ATP 产生的色素（见 13.3 节）。极端嗜盐古生菌栖息在盐湖、盐场或者其他高盐环境中。一些极端嗜盐菌，如嗜盐碱杆菌属（*Natronobacterium*）栖息在苏达湖中，这种环境含有很高的盐分和 pH。因此这些有机体是嗜碱的，其生活环境的 pH 值要高于其他已知的有机体。

最后一个要讨论的古生菌是嗜热嗜酸菌，如热原体属（*Thermoplasm*）（图 2.21），这些原核生物有细胞膜却没有细胞壁（在这一方面与支原体类似），生活在中等温度和很低的 pH 环境中。这一类群包括嗜酸菌属（*Picrophilus*），它是目前已知的最为嗜酸（acidophilic）的原核生物（表 2.1）。

天然微生物群落的系统进化分析

并非所有古生菌都是嗜极端生物。湖泊、土壤和海洋中也存在着很多古生菌。不幸的是这些微生物无法在实验室条件下培养，因此我们不知道它们在栖息地里的活动。这和一些无法培养的细菌情况相同。如果无法对这些微生物进行培养，我们如何知道它们就在此处？我们可以知道这些，因为我们可以分离天然样品的核糖体 RNA 基因，因为产生这些 RNA 的有机体就存在于此天然样品中。如果我们对这些样品进行处理，分离到核糖体 RNA 基因，并将它们测序，我们可以像培养的不同有机体那样将它们放在系统树上进行分析（图 2.9 和图 2.18）。

由美国微生物学家 Norman Pace 发明的分子生态学的方法，使我们对原核生物的多样性有了清晰的认识，原核生物的多样性要比想像的更大。对任何一种天然样品的分析发现，在这种栖息环境中还有大量的原核生物没有被发现。现在的挑战是捕捉并掌握足够多的关于这些无法培养的微生物的知识，然后设计一些方法培养这些微生物。在无

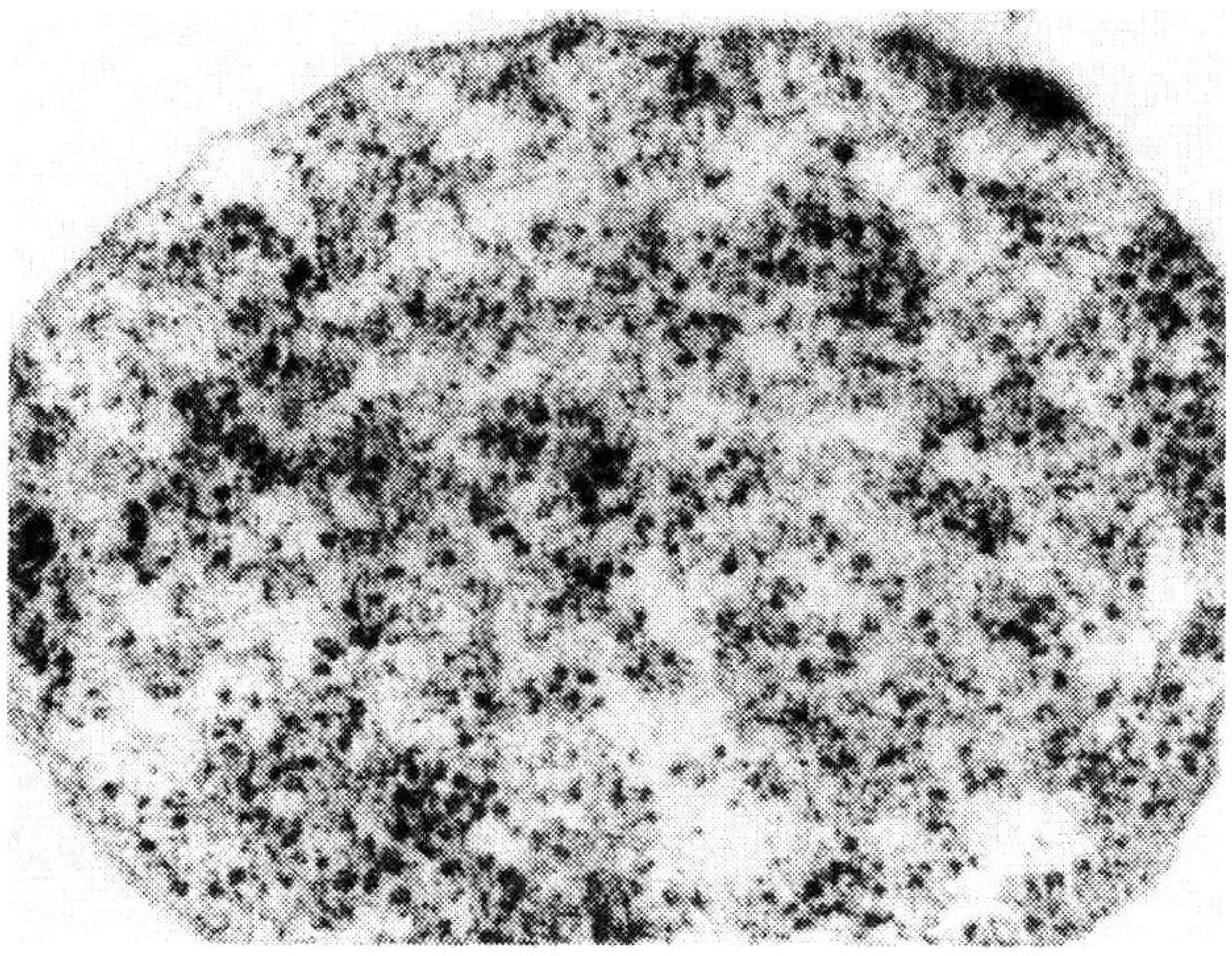


图 2.21　极端嗜酸原核生物。在这里显示的是无细胞壁的古生菌——热原体属及与它关系较近的嗜酸菌属（表 2.1），它们生活在中等温度和极低 pH 值的环境中。真细菌的一些成员，如支原体属也含有一些缺少细胞壁的种，将在第 12.21 节和第 13.5 节中讨论无细胞壁原核生物。

法培养的古生菌和真细菌（环境基因组学，见 18.6 节）的基因组分析方面有所帮助。因为鉴定这些没有培养的有机体的所有基因会揭示它们的代谢能力。对这些有机体的代谢蓝图的认识将会帮助我们设计特定的分离这些有机体的方法。

概念检查

真细菌和古生菌域中存在着一些谱系，并且还存在着形态学和生理学多样性。对来自天然样品的核糖体 RNA 分析表明，这些样品中还存在着很多具有不同进化关系、无法培养的原核生物。

◆ 在你的消化道中栖息着哪些重要的细菌属于变形细菌？

◆ 为什么说蓝细菌为地球上其他高等生命形式的进化做了准备？

◆ 盐杆菌属（*Halobacterium*）有何特殊之处？

◆ 在不进行实验室培养的情况下如何知道一种特定的原核生物谱系存在于天然栖息地中？

2.6 真核微生物

真核微生物通过其特定的细胞结构（图 2.1）与进化历史（图 2.7）联系在一起。观察真核生物域就会发现，在真核生物的系统树上有一个长的分支——植物和动物。有趣的是，与它们在系统树的位置一致，有些早期分支的真核生物结构简单，缺少线粒体和一些其他关键的细胞器。例如，双滴虫（Giardia；图 2.22）似乎是那些没有参与内共生或者已经丢失内共生的原始真核细胞的现代后裔（见 2.3 节、11.3 节和 14.4 节）。

大多数早期的真核生物是人体及其他动物的寄生虫，它们不能单独自由生活而相互依赖。

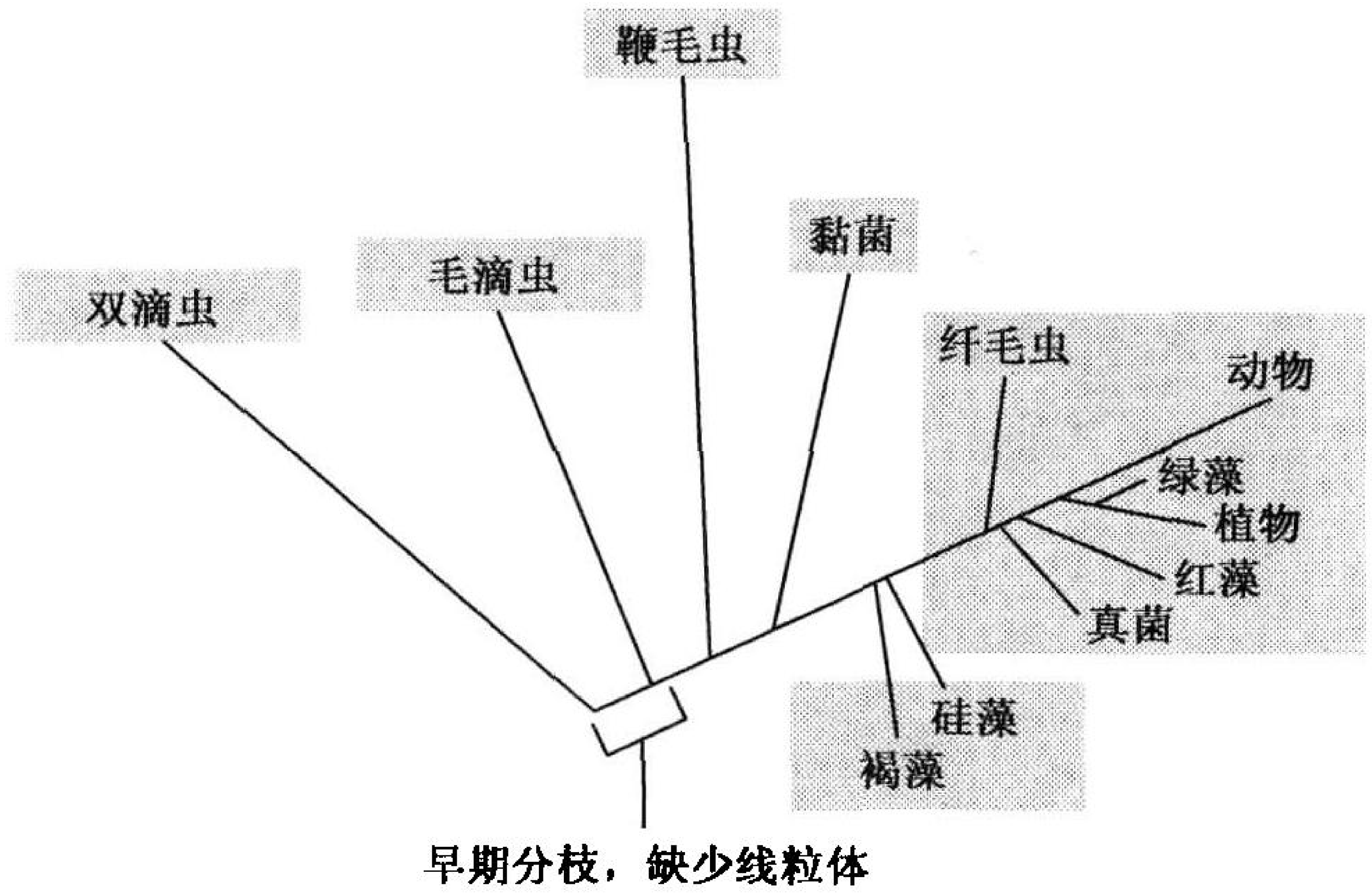


图 2.22 真核域的详细进化树。并非所有的真核生物都表示在这张图中。早期分支的一些种缺乏除了细胞核外的其他细胞器。注意高等有机体（植物和动物）是如何在树的顶端分支的。

真核微生物的多样性

与原核生物一样，真核生物同样具有多样性。总的来讲，我们把微小的真核生物叫做原生生物（Protista 或 Protists）。某些原生生物如藻类（图 2.23a）是光养型的。藻类有富含叶绿素的细胞器——叶绿体，可以在只含有少数几种矿物质（如 K、P、Mg、N、S）、H_2O、CO_2和光的情况下生存。藻类栖息在土壤和水中，是自然界的主要初级生产者。真菌（图 2.23b）缺少光合色素，其细胞（酵母）或者是单细胞的或者是丝状体的（霉菌）。真菌是自然界中主要的生物降解者，能重复利用土壤和其他生态系统中的有机物。

藻类和真菌有细胞壁，而原生动物没有（图 2.23c）。大多数原生动物是可以运动的，自然界的水环境中栖息着很多不同的种，有些是人类或者其他动物的病原。真核生物域的系统树上分布着不同的原生生物。有些如鞭毛虫是分支比较早的种，而另外一些如带纤毛的种草履虫（*Paramecium*）（图 2.23）是分支比较晚的（图 2.22）。黏菌与原生生物相似，它们可以运动并缺少细胞壁。然而，它们之间不仅在进化上有一些不同的地方，而且黏菌的细胞还经历了一个细胞周期。在黏菌的细胞周期中，运动的细胞聚集到一起形成一个多细胞结构叫做子实体（fruiting body），子实体产生的孢子可以形成新的运动细胞（14.11 节）。黏菌是最早知道的细胞之间能协同作用产生显微结构的原生生物。

地衣（Lichen）是一种叶片状结构，经常在石头、树木和一些其他的物质表面上发现（图 2.24）。地衣是一个微小共生体（mutualism）的例子，两种生物生活在一起，互惠共生。地衣包括真菌和它的功能营养的伙伴，或者是藻类（真核生物）或者是蓝藻（原核生物）。光养的有机体是初级生产者，而真菌为光养生物提供了锚定和保护功能。因此地衣是一种动态的有机体，它已经在两种差别很大的微生物之间进化形成了成熟的

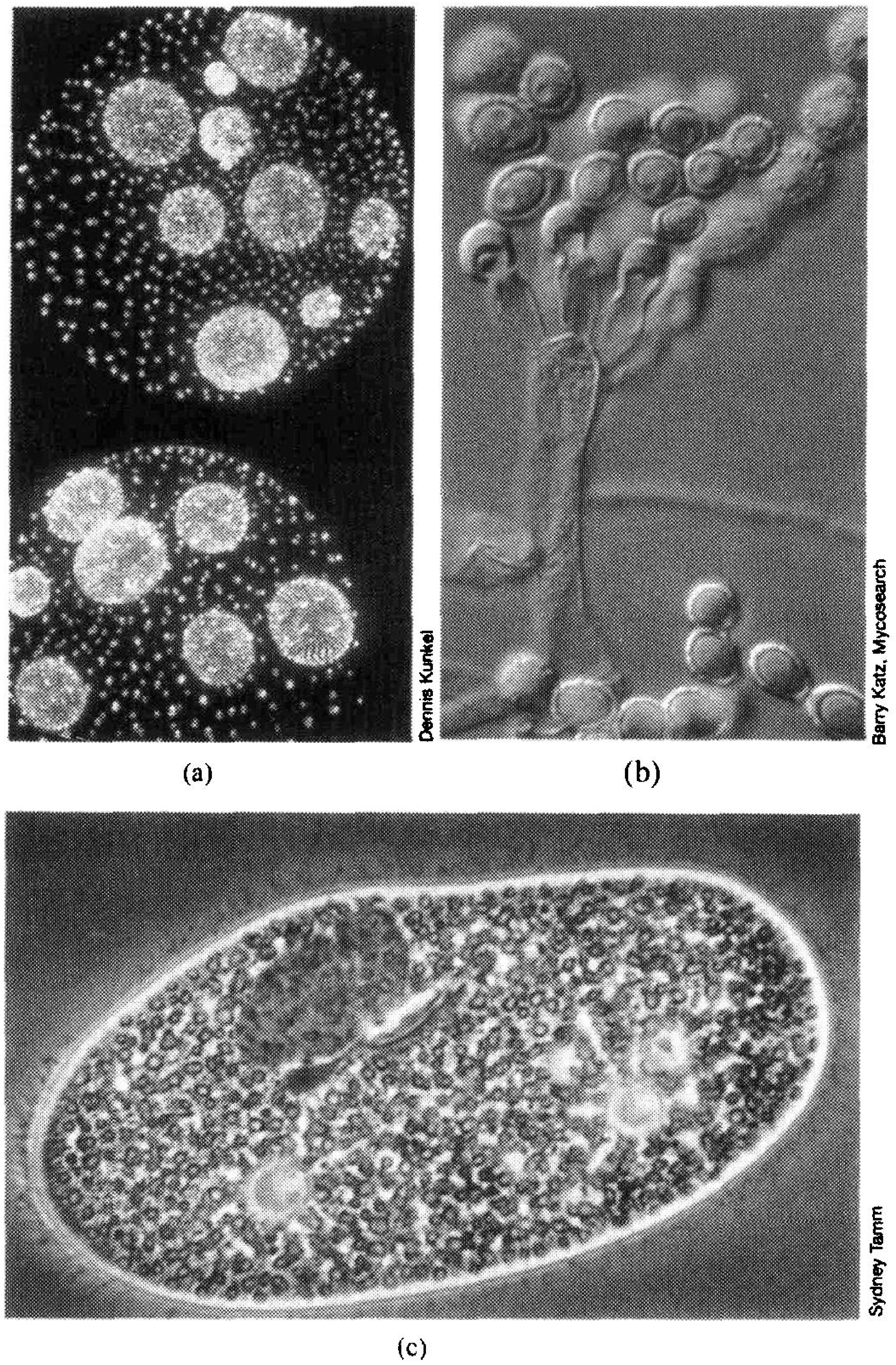
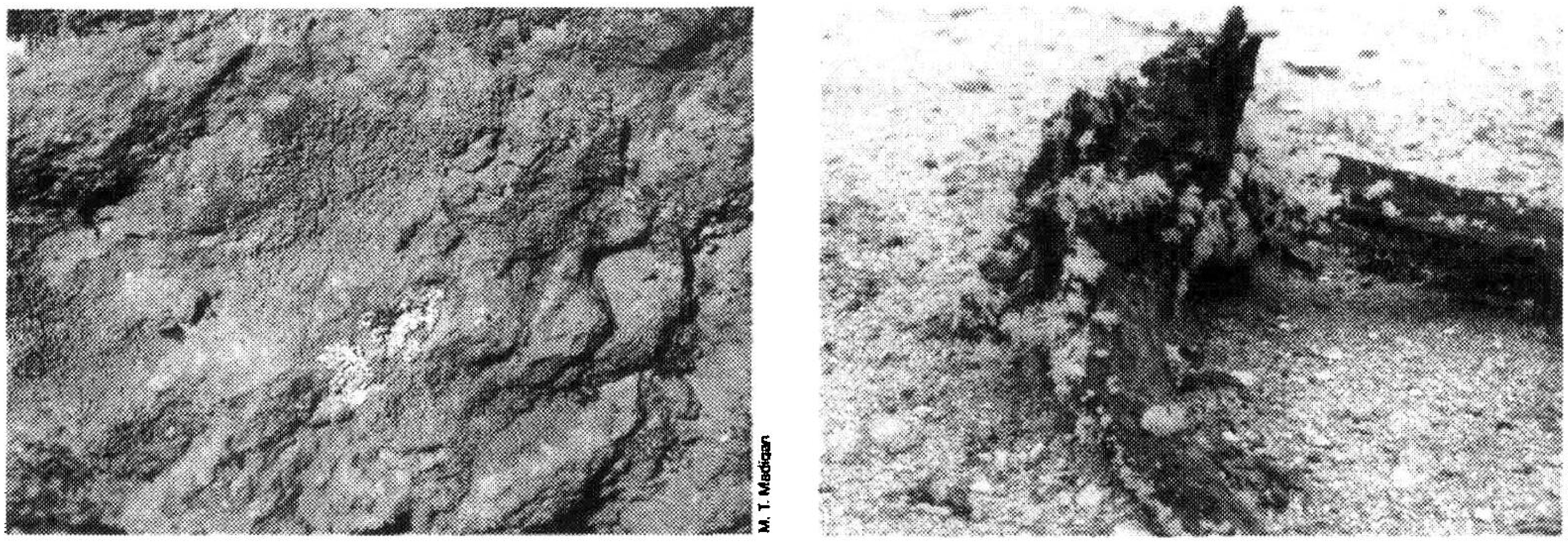


图 2.23　微小真核生物。（a）藻类：群集的绿藻，团藻虫属（*Volvox*）（见 14.13 节）每个椭圆形细胞都含有了几个光养的光合细胞器叶绿体。（b）真菌：典型霉菌的产孢结构。每个孢子都能产生出新的丝状真菌（见 14.12 节）。（c）原生生物：带纤毛的原生生物草履虫（*Paramecium*）（见 14.10 节），纤毛的作用像桨一样，赋予细胞运动性。

共生关系。

总结

在此我们只是对微生物多样性进行了简短介绍。还有更多内容要在第 12～15 章中提到。也许人们注意到在这里没有提到病毒。我们知道病毒不是细胞，但是它们的复制需要细胞（见 2.1 节）。所有的生命域中都有病毒寄生，会在后面几章中涉及病毒的多样性（第 9 章和第 16 章）。



(a) (b)

图 2.24 地衣。(a) 一种生长在石头上的橘红色地衣和 (b) 一种生长在美国黄石国家公园一块腐树干上的黄色地衣。地衣的颜色来自地衣结构中的藻类成分。除叶绿素之外，地衣的藻类成分还含有胡萝卜素（见 17.3 节），可以是黄色、橘红色、棕色、红色或者紫色。

在对微生物多样性进行更为详细的讨论之前，我们必须熟悉细胞的分子特性，尤其是对原核细胞。在此过程中，会学到很多有机体的化学多样性，这也是生命树进化的直接结果。然后才能够很好地理解微生物多样性。

概念检查

微小的真核生物是一个包括藻类、原生生物、真菌和黏液菌在内的多样化群体。有些藻类和真菌已经形成了共生体叫做地衣。

◆ 列出至少两种藻类与蓝细菌的区别。

◆ 地衣的各个不同组分之间如何互惠互利?

复习题

1. 为什么细胞需要原生质膜?（见 2.1 节）
2. 哪个生命域有原核细胞结构? 原核细胞结构可以预测进化关系吗?（见 2.1 节）
3. 病毒与细胞有哪些相似之处和不同之处?（见 2.1 节）
4. 基因组（genome）是什么? 真核生物和原核生物的基因组排列有何不同?（见 2.2 节）
5. 为什么使真核细胞会发生有丝分裂（mitosis）和减数分裂（meiosis）?（见 2.2 节）
6. 大肠杆菌中含有多少基因? 它与人类的一个细胞中的基因有何差异?（见 2.2 节）
7. 什么是内共生理论?（见 2.3 节）
8. 分子生物学的研究表明古生菌中的许多大分子物质与真核生物中相应的部分要比细菌相似性高。请解释。（见 2.3 节）
9. 从能量代谢的角度阐述化能有机营养生物和化能无机营养生物的不同之处? 它们所利用的碳源什么? 据此可以说它们是异养生物和自养生物吗?（见 2.4 节）

10. 火叶菌属（*Pyrolobus*）有何特殊之处?（见 2.5 节）
11. 火叶菌属、盐杆菌属（*Halobacteria*）和热原体属（*Thermoplasma*）三者有何相同和不同之处?（见 2.5 节）
12. 观察图 2.18，解释环境-海洋（Env-marine）谱系的意思?（见 2.5 节）
13. 贾第虫属（*Giardia*）和人类细胞在结构和系统进化方面有何不同?（见 2.6 节）

应用题

1. 原核生物的质粒可以永久地丢失而没有不良影响。将染色体去除后却是致死性的，为什么?
2. 据说人们知道大型生物的进化关系要比微生物早，为什么构建如马的谱系进化关系要比构建任何一个原核生物谱系的进化关系要容易?
3. 观察图 2.6 的系统进化树，利用显示的序列信息描述一下一旦有机体 2 和 3 的位置被转换，如果系统树的分支不发生改变，是否意味着进化树是不正确的?
4. 微生物学家已经分离培养了大量微生物，但是他们知道还存在着很多微生物，尽管他们从来没有看到过或者在实验室里培养过这些有机体。请解释。
5. 你可以利用本章的哪些数据去说服你的朋友相信，嗜极端生物不仅仅是那些在各自的栖息地中永久生存的个体?
6. 为以下观点作辩护：如果没有蓝细菌，生命将会严格保持在微小状态。

（魏东盛　译，陈月华　校）

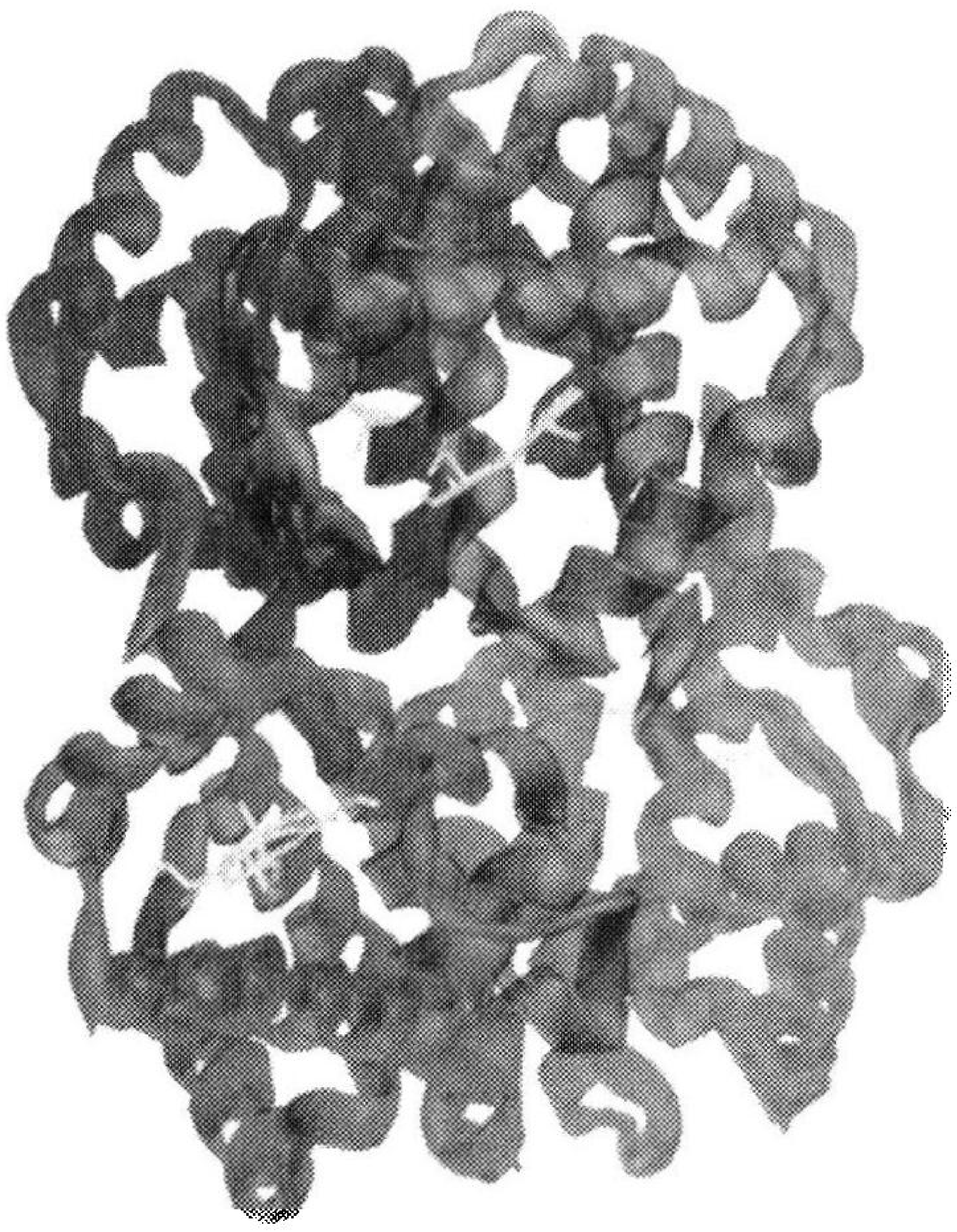
3

大 分 子

Ⅰ 化学键和生物体系中的水

Ⅱ 非信息大分子

Ⅲ 信息大分子



蛋白质是一类关键的大分子，其结构决定其功能。

词汇表

共价键（covalent bond）：两个原子间共用成键电子对的一种化学键

变性（denaturation）：通常是蛋白质折叠状态的破坏，并导致生物活性的丧失

结构对映体（enantiomer）：一个分子互为影像的两种形式

糖苷键（glycosidic bond）：多糖中连接单糖单元的一种共价键

氢键（hydrogen bond）：氢原子和另外一种原子之间的弱化学键，这种原子为电荷负性较强的元素，通常为氧原子或氮原子

同分异构体（isomers）：两个分子具有相同的分子组成，但结构不同

脂类（lipid）：甘油以酯键或醚键与脂肪酸及其他基团（如磷酸）的连接物

大分子（macromolecule）：单体单元共价连接而形成的多聚体

分子（molecule）：两个或多个原子相互间以化学键结合

非极性（nonpolar）：有疏水（排斥水）特征，且难溶于水

核酸（nucleic acid）：DNA或RNA

核苷（nucleoside）：无磷酸基团的核苷酸

核苷酸（nucleotide）：核酸的基本结构单位，含有一个碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶）、一分子磷酸和一个糖（在RNA中是核糖，在DNA中是脱氧核糖）

肽键（peptide bond）：连接多肽链中各种氨基酸的一种共价键

磷酸二酯键（phosphodiester bond）：在多核苷酸中连接各种核苷酸的一种共价键

极性（polar）：有亲水特征，且通常是水溶性的

多聚体（polymer）：通过聚合作用形成的化合物，由叫做单体的重复单位组成

多核苷酸（polynucleotide）：多个核苷酸以磷酸二酯键相互连接而成的多聚体

多肽（polypeptide）：多个氨基酸以肽键相互连接而成的多聚体

多糖（polysaccharide）：单糖单体间以糖苷键相互连接而成的多聚体

一级结构（primary structure）：在信息大分子（如多肽）中，单体单位的精确序列

蛋白质（protein）：由一个或多个多肽组成的具有一定生物学功能的分子

四级结构（quaternary structure）：在最终的蛋白质分子中，各多肽的数目和类型

二级结构（secondary structure）：多肽或多核苷酸折叠的最初模式，通常是由氢键键合的机会决定的

三级结构（tertiary structure）：具有二级结构的多肽的折叠结构

Ⅰ 化学键和生物体系中的水

要知道细胞如何工作，关键是要对细胞内的分子状况和其中的化学过程有一定的了解。分子，尤其是大分子（macromolecule），是细胞的“内脏”，也是本章的主题。读者需要对基础化学，尤其是对原子和原子键合的性质有所了解。我们将在此基础上简单介绍相关的生物化学键，然后对四种大分子的结构与功能进行讨论，它们分别是：多糖（polysaccharide）、脂类（lipid）、核酸（nucleic acid）和蛋白质（protein）。

3.1 强弱化学键

构成生命的主要化学元素包括氢、氧、碳、氮、磷和硫，这些元素可以通过许多种方式键合形成生物分子。2 个或多个原子通过化学键连接起来形成分子。因此，两个氧原子（O）可以结合成 1 个氧分子（O_2）。碳（C）、氢（H）和氧原子（O）可以结合形成葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$，一种己糖）。

生命化学元素之间可以形成强键，其电子可以在原子间共享，这类键叫做共价键（covalent bond）。定义共价键，可以水分子的形成为例，其组成元素为 O 和 H：

$$\cdot\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}\cdot + 2H\cdot \longrightarrow H:\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}:H$$

氧原子在其外层有 6 个电子，而氢原子只有 1 个电子。当它们结合成 H_2O 时，共价键将 3 个原子紧密联结在一起。在分子基础上，可以形成双价或三价共价键，键的强度随着价数而显著增加（图 3.1）。

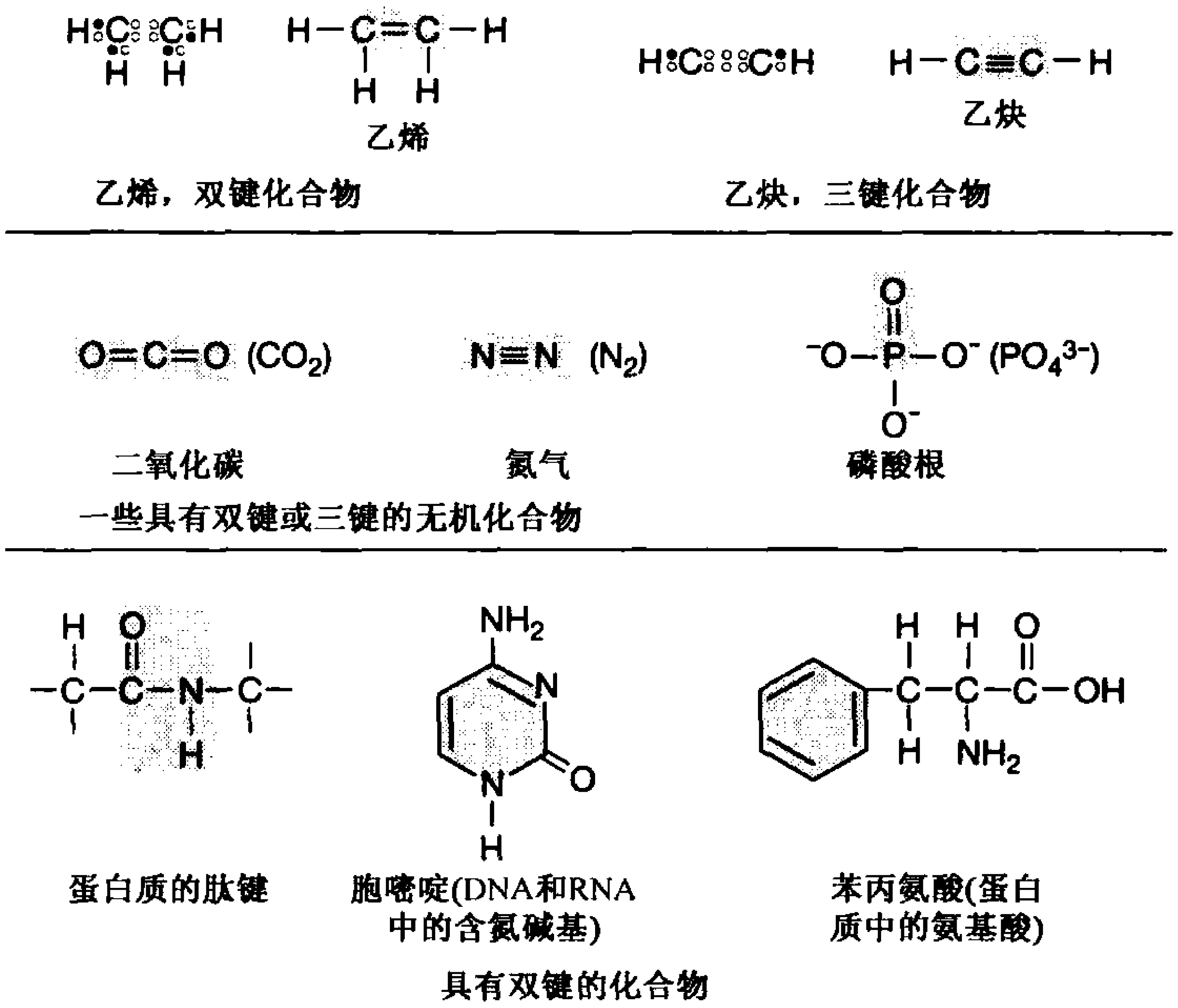


图 3.1 一些具有双键或三键的分子的共价键合。图示乙烯和乙炔分子的电子构型。

生命化学元素以各种方式结合，形成大分子的组成单元，称为单体（monomer）。大分子则称为聚合物（polymer），是由重复的单体组成的化合物。已知有数千种不同的单体，但只有相对少数的单体在四种大分子中占有重要地位。一旦形成大分子，其单体的化学特性在很大程度上决定着该分子独有的结构与功能。

氢键

除共价键外，很多较弱的化学键也在生物分子中发挥了重要作用，其中氢键最为重要。氢键（hydrogen bond）（图 3.2）是在氢原子和电荷负性较强的元素（如氧和氮）

之间形成的。由于氧原子是相对的电荷负性原子，而氢原子则不是，所以氧原子和氢原子间共价键的外层共用电子对更靠近氧原子核。由于电子带一个负电荷，这便产生了一个轻微的电荷偏离，氧微带负电，氢微带正电（图 3.2a）。一个单独的氢键非常微弱，但当在大分子内部和大分子之间形成大量氢键时，该分子的整体稳定性则大为增强。

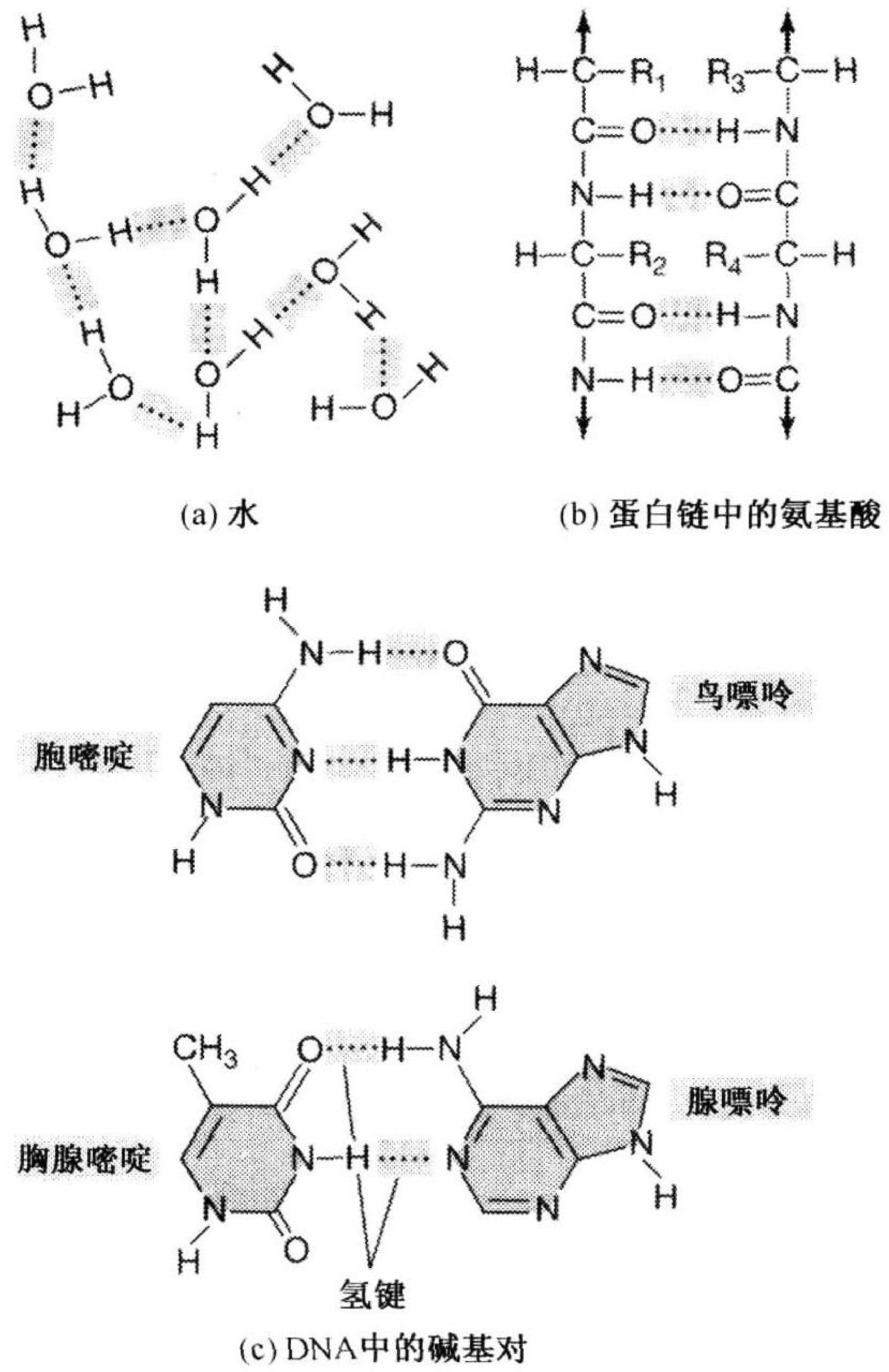


图 3.2　氢键。在核酸中，氢键经常被看作线状而非点状，在 A/T 碱基对中有两条线，在 G/C 碱基对中有三条线（图 3.11）。在（b）中，R 代表各氨基酸中的侧链（图 3.12）。

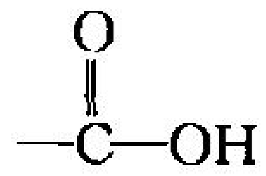
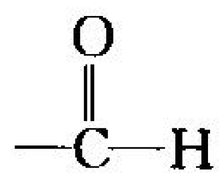
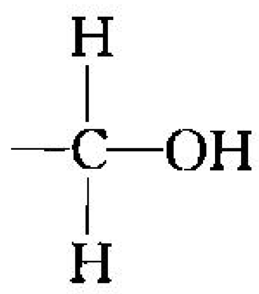
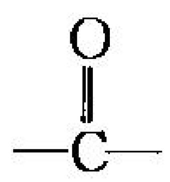
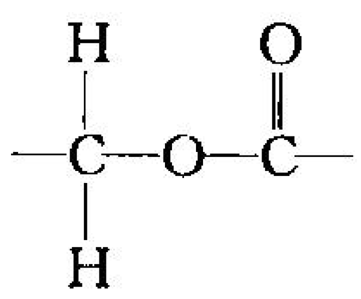
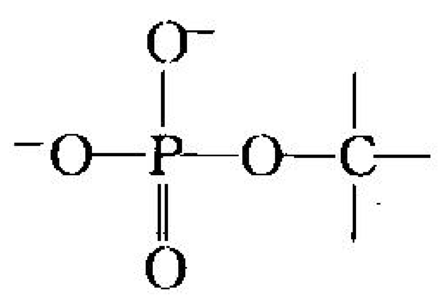
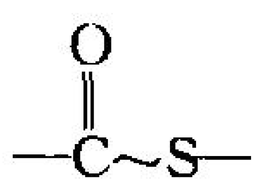
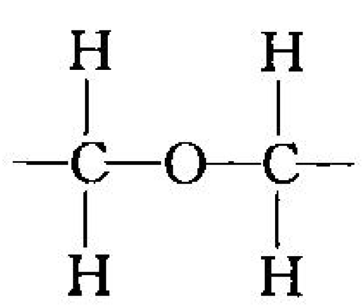
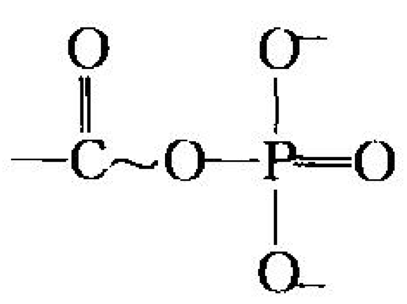
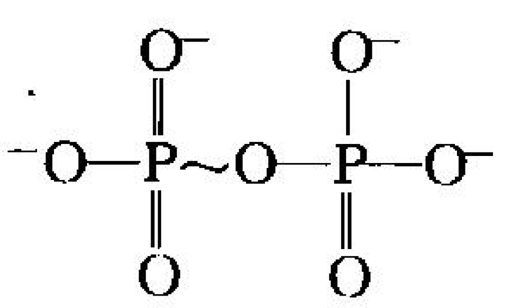
水分子容易进行氢键键合（图 3.2a），该特性赋予水分子显著的极性。由于具有极性（polar），水分子之间便相互作用，而疏离其他非极性（nonpolar）（疏水性）分子。水分子在溶液中可以自我定位，带有微弱正电荷的氢原子可以与两个带负电荷的氧原子结合。这种结合方式称为氢键。

氢键也可以在大分子的原子之间形成（图 3.2b 和图 3.2c）。这些弱电子力在大分子（如蛋白质）中积累，增加了分子的稳定性，并影响其整体结构。我们将在后面的内容中了解到氢键在蛋白质（图 3.2b）和核酸（图 3.2c）的生物学特性中发挥的重要作用（见 3.5 节、见 3.7 节、见 3.8 节）。

其他弱键

生物分子也形成其他种类的弱相互作用。例如，范德华力（van der Waals force）是当原子间距离小于 3～4Å 时发生于分子间的弱吸引力。范德华力在底物与酶的结合（见 5.5 节）和蛋白质—核酸的相互作用中发挥重要作用。离子键（ionic bond）（如 NaCl 中 Na^+ 与 Cl^- 之间）是在水溶液中可以电离的离子间的弱静电相互作用。许多重要的生物分子，如羧酸和磷酸（表 3.1），在细胞质 pH 水平（通常 pH6～8 时）下呈电离状态，因此可以在细胞质中充分溶解。

表 3.1 生物化学中重要的功能基团

化学种类	结构	生物学重要性
羧酸		有机物、氨基酸和脂肪酸
醛		还原性糖（如葡萄糖）的官能团
醇		脂类、碳水化合物
酮		丙酮酸、柠檬酸循环中的中间物
酯		细菌和真核细胞中的脂类、与 tRNA 结合的氨基酸
磷酸酯		核酸、DNA 和 RNA
硫酯		能量代谢、脂肪酸的生物合成
醚		古生菌的脂类、鞘脂类
酸酐		能量代谢，如乙酰磷酸
磷酸酐		能量代谢，如 ATP

～代表高能键（见 5.8 节）。

疏水相互作用（hydrophobic interaction）在生物分子中也很重要。疏水相互作用是非极性分子或极性分子的非极性区域在极性环境中趋于紧密结合的作用。疏水相互作用在蛋白质结合和底物与酶的结合（见5.5节）中发挥重要作用。此外，疏水相互作用常用于控制不同的亚基在多亚基蛋白质中如何彼此结合以形成生物活性分子，并且对于RNA的稳定具有重要作用。

生物分子的结合类型

碳元素是所有大分子的主要组成成分。碳原子不仅可以自身结合，而且可以与很多其他元素结合，以形成具有足够多样性与复杂性的大结构。在不同的有机（含碳原子）化合物中，有许多可能的键合方式。每一个功能基团都有其独特的化学特性，该性质决定其在细胞中的生物学作用。对这些功能性基团的了解，将使得以后对于大分子结构、细胞形态和生物分析的讨论更容易一些。表3.1列举了几个具有重要生化作用的功能性基团，以及包含该基团的分子和大分子。

概念检查

共价键是大分子中元素之间结合的强键。弱键，如氢键、范德华力和疏水相互作用，通过更微妙的原子间相互作用影响大分子的结构。包含碳原子在内的一系列功能性基团在生物分子中普遍存在。

◆ 为什么共价键比氢键要强？

◆ 氢键如何在大分子结构中发挥作用？

3.2 大分子概述和作为生物溶剂的水

如果你用化学方法分析原核细胞，例如，普通的肠道细菌——大肠杆菌（*Escherichia coli*），你能够发现什么？你会发现水是其主要成分，除去水你可以发现大量大分子、少量单体和一些无机离子（表3.2）。细胞干重的95%由大分子组成，其中蛋白质最为丰富（表3.2）。

表3.2　原核细胞的化学组成[a]

分子	干重百分比[b]	细胞中的分子数（不同种类）
全部大分子	96	24 610 000（约2500）
蛋白质	55	2 350 000（约1850）
多糖	5	4300（2）[c]
脂类	9.1	22 000 000（4）[d]
脂多糖	3.4	1 430 000（1）
DNA	3.1	2.1（1）
RNA	20.5	255 500（约660）
全部单体	3.0	—[e]（约350）

续表

分子	干重百分比[b]	细胞中的分子数（不同种类）
氨基酸及其前体	0.5	—（约 100）
糖及其前体	2	—（约 50）
核苷酸及其前体	0.5	—（约 200）
无机离子	1	—（18）
总计	100%	—

a. 数据来自 Neidhardt F C, et al. 1996. American Society for Microbiology, Washington, DC.

b. 活跃生长的大肠杆菌（*Escherichia coli*）细胞干重≈2.8×10^{-13}g；总重（70%含水量）= 9.5×10^{-13}g。

c. 在此假定肽聚糖和糖原是主要的多糖。

d. 磷脂有几类，由于脂肪酸组成的可变性和不同的生长条件，每一类都有多种存在形式。

e. 单体和无机离子组成缺乏可靠依据。

蛋白质（protein）是氨基酸单体的聚合物。蛋白质广泛存在于细胞中，既有结构功能又有催化（酶）功能（图 3.3a）。一个普通细胞通常具有数以千计的不同类型的蛋白质（表 3.2）。

核酸是核苷酸的多聚物，在细胞中有两种形式：RNA 和 DNA 。核糖核苷酸（RNA）是除蛋白质之外在活跃生长的细胞中含量最丰富的大分子（表 3.2 和图 3.3b）。这是由于在每个细胞中都有数千个核糖体（生产蛋白质的"机器"），核糖体由 RNA 和蛋白质组成。此外，少量 RNA 形成信使 RNA 和转运 RNA，二者在蛋白质合成中发挥关键作用。与 RNA 相反，DNA 在细菌细胞中含量（按重量）相对较少（表 3.2）。尽管数量较少，DNA 作为遗传信息的载体在细胞功能中发挥重要作用。

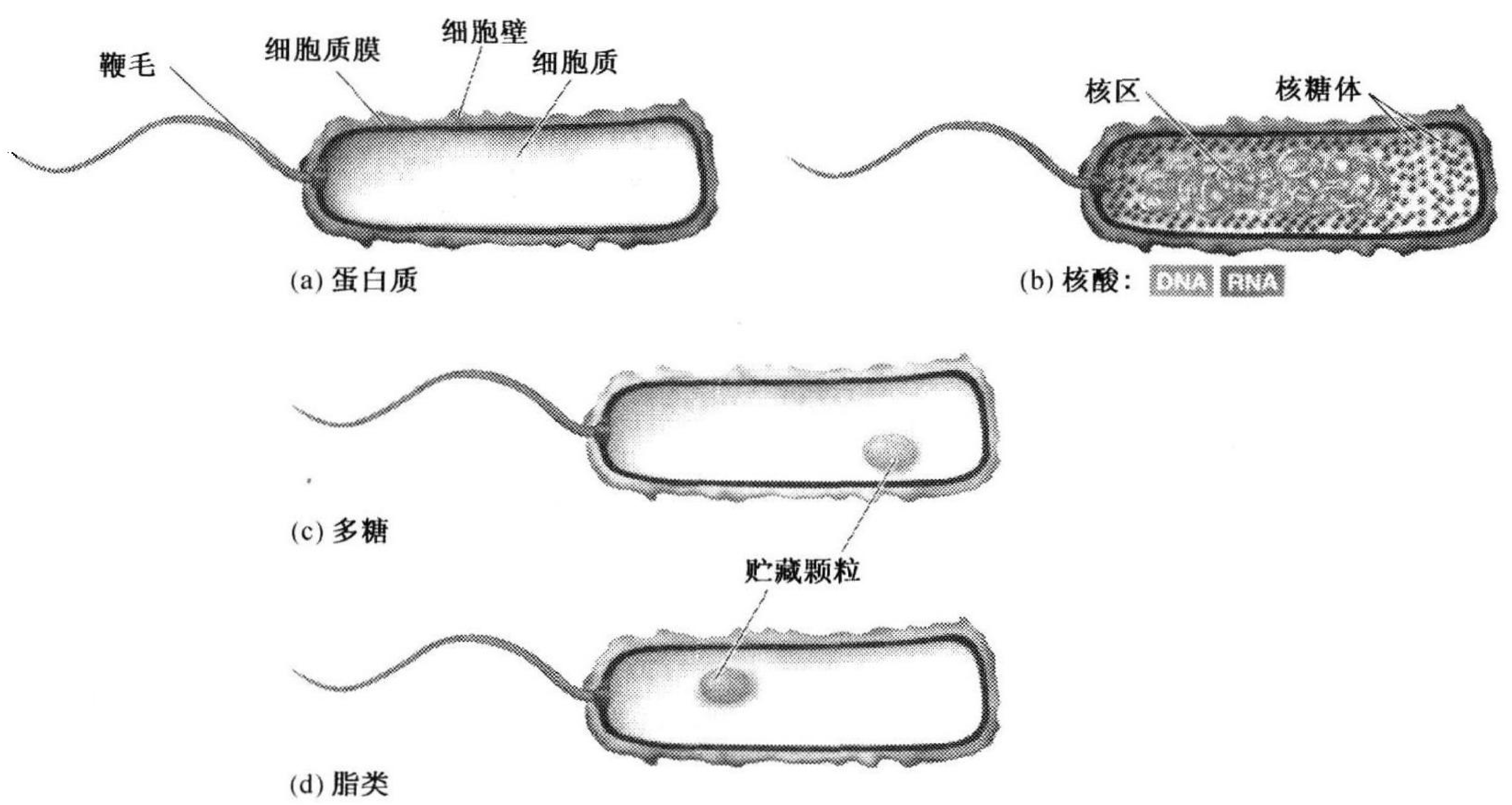


图 3.3 大分子在细胞中的定位。(a) 蛋白质（灰色）作为细胞结构和酶广泛存在于细胞中。鞭毛是与游动性有关的结构。(b) 核酸。DNA（绿色）存在于原核细胞的核区和真核细胞的细胞核中。RNA（橙色）存在于细胞质（mRNA、tRNA）和核糖体（rRNA）中。(c) 多糖（黄色）定位于细胞壁中，偶尔出现在贮藏颗粒中。(d) 脂类（蓝色）存在于细胞质膜、细胞壁和贮存颗粒中。

脂类既有疏水特性又有亲水特性，在膜结构中起关键作用，也可作为多余碳原子的贮藏库（图 3.3d）。多糖是糖的多聚物，主要在细胞壁中存在。多糖（如糖原，见以后章节）常与脂类结合，是细胞中碳和能量的主要贮存方式（图 3.3c）。

作为生物溶剂的水

细胞中的大分子和其他分子浸润在水中。水具有重要的化学特性使其成为理想的生物溶剂。事实上，水是生命不可缺少的物质。水的两个关键特性：极性和黏结性（也称内聚性）使其成为很好的溶剂。

水的极性特征很重要，因为许多重要的生物分子（表 3.2）本身都是极性的，都可以溶解于水中。我们将在第 4 章中学习到，可溶性物质通过运输活动持续地进出细胞质膜（见 4.6 节和 4.7 节）。这些物质包括构建新细胞材料的营养物质，也包括代谢过程的废物。

由于不断增强的氢键的作用，水的极性特征也促使大分子发生聚合。水分子自身（图 3.2a）和在大分子内部形成三维网状结构。据此，水分子帮助定位生物分子内部的原子，以使其发生相互作用。水的高极性也对细胞有利，它使得非极性物质趋于聚合在一起。以细胞膜为例，细胞膜包含大量脂类，这些脂类含有许多非极性（疏水性）成分，它们趋于聚合在一起，从而阻止极性分子自由进出细胞膜。

除了氢键以外，水的极性也使其具有高黏性。这意味着水分子对彼此有很高的亲和性，它们形成有序的化学排列，其中的氢键（图 3.2）不断地形成、断开、再形成。水的黏性特征赋予其重要的生物学特性，如高表面张力和高比热（温度上升 1℃所需要的热量）。此外，水在凝结时变成较低密度的固体形式（冰），这对生活在适温、极性的水生生境中的生命有重要意义。例如，在湖泊中，表面的冰使得冰下面的水不会凝结，使得水生生物可以在冰以下的水中生存。

大约在 40 亿年前生命起源于水生生境，几乎在地球上任何有水的地方都有微生物存在。了解了水的这些重要特性，我们现在开始学习生物大分子的结构（表 3.2 和图 3.3）。

概念检查

蛋白质是细胞中含量最丰富的一类大分子。其他大分子包括核酸（DNA 和 RNA）、脂类、多糖和脂多糖。水由于其极性和聚合性，是极好的生物溶剂。

◆ 为什么蛋白质和 RNA 在活跃生长的细胞中占据很大的比例？

◆ 为什么水的高极性能够使其成为良好的生物溶剂？

Ⅱ 非信息大分子

在本节里我们研究非信息大分子——多糖和脂类的结构与功能。尽管这些大分子的单体的序列不携带遗传信息，但这些大分子本身仍具有很重要的作用，主要作为结构和贮存物质。

3.3 多糖

糖类（carbohydrate）是碳、氢和氧之间以 1∶2∶1 组成的有机化合物。葡萄糖是所有糖类中含量最丰富的单糖，其结构式为 $C_6H_{12}O_6$（图 3.4）。与生物学具有最大相关性的糖类是那些含有 4、5、6 和 7 个碳原子的糖类（表示为 C_4、C_5、C_6 和 C_7）。C_5 糖（戊糖）由于是核酸的结构骨架而显得极为重要。此外，C_6 糖（己糖）是细胞壁多聚物和能量储存物质的单体组分而显得特别重要。图 3.4 是一些常见糖类的结构式。

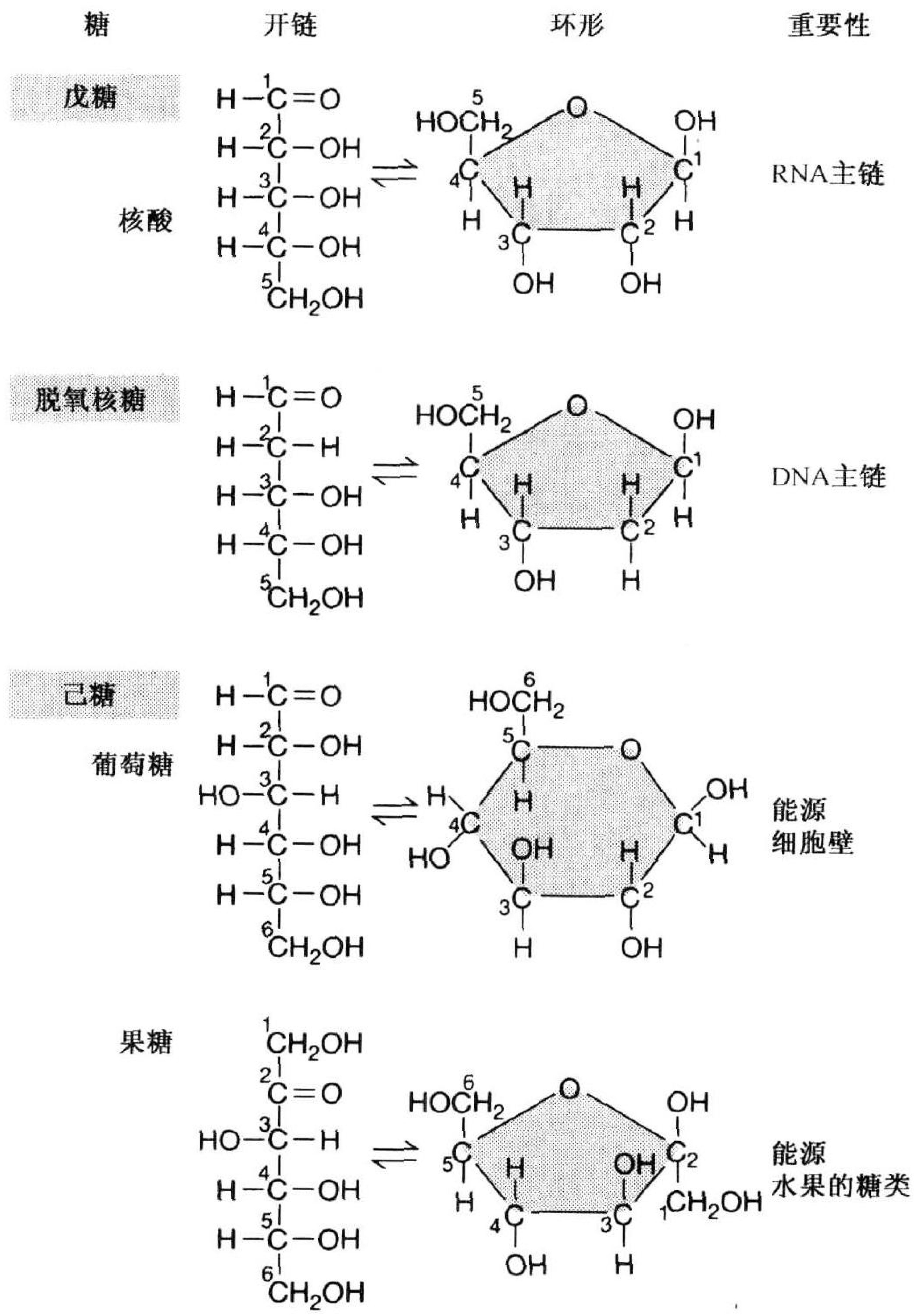


图 3.4 一些常见糖类的结构式。结构式可以用开链和环形两种互替形式来表示。开链结构比较直观，但常见的是环形结构。注意碳原子标记数字的顺序。

简单糖类的一个或多个羟基被其他基团取代后就形成其衍生物。例如，肽聚糖（peptidoglycan）是细菌细胞壁的重要多聚物，它含有葡萄糖的衍生物 *N*-乙酰葡萄糖胺（图 3.5）。除了糖的衍生物以外，具有相同化学式的糖类的立体异构特征也不相同（见 3.6 节）。因此，细胞可利用各种单糖来构建多糖。

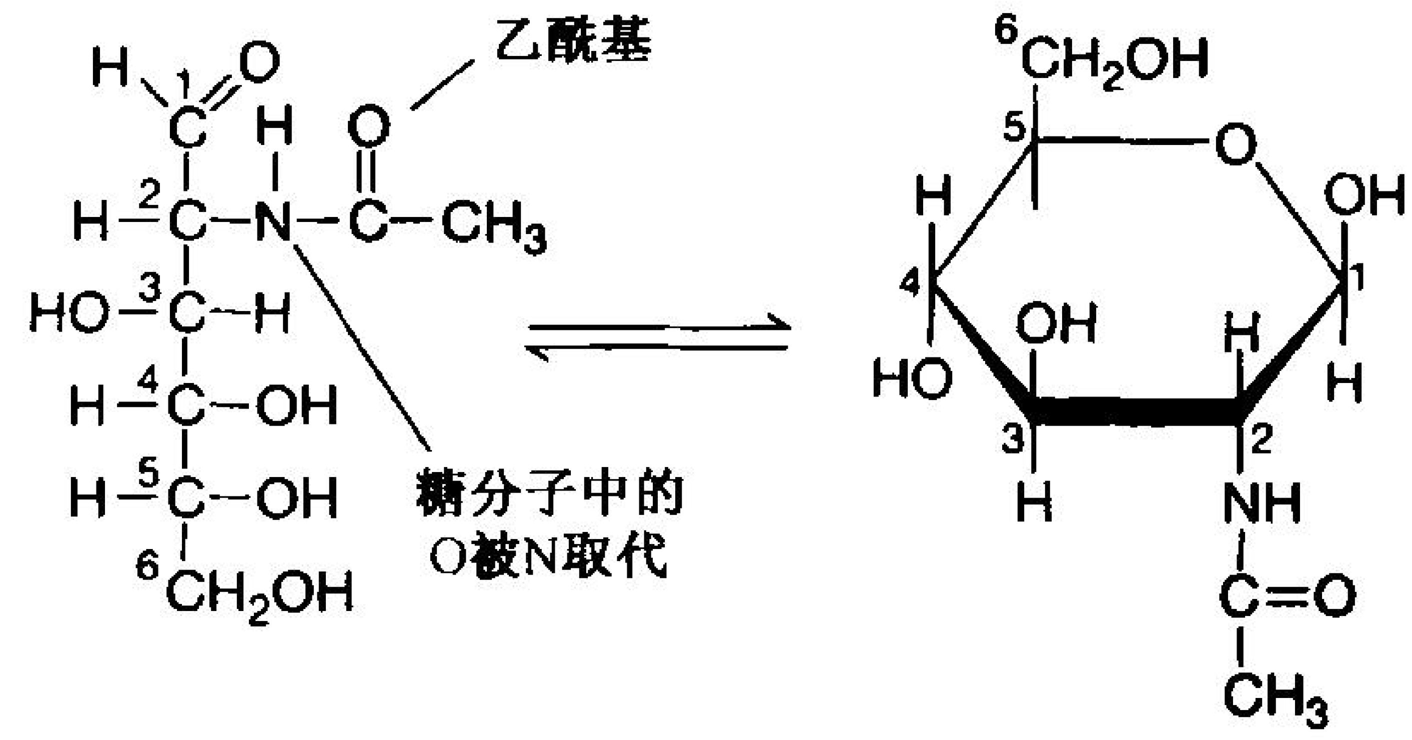


图 3.5　*N*-乙酰葡糖胺，葡萄糖的衍生物。*N*-乙酰葡糖胺是一些细菌的细胞壁多糖肽聚糖的重要组成成分（见 4.8 节）。

糖苷键

多糖（polysaccharide）是一类包含许多（有时候数百甚至数千）单糖单体的碳水化合物。单糖之间由共价键相连接，称为糖苷键（glycosidic bond）（图 3.6）。如果两个单糖分子由糖苷键连接，得到的分子则称为二糖。在此基础上再连接上一个单糖分子，则得到三糖。数个连在一起称为寡糖。非常长的链则称为多糖。

糖苷键有 α 和 β 两种定向（图 3.6a）。具有重复结构的多糖是细菌、植物和动物中

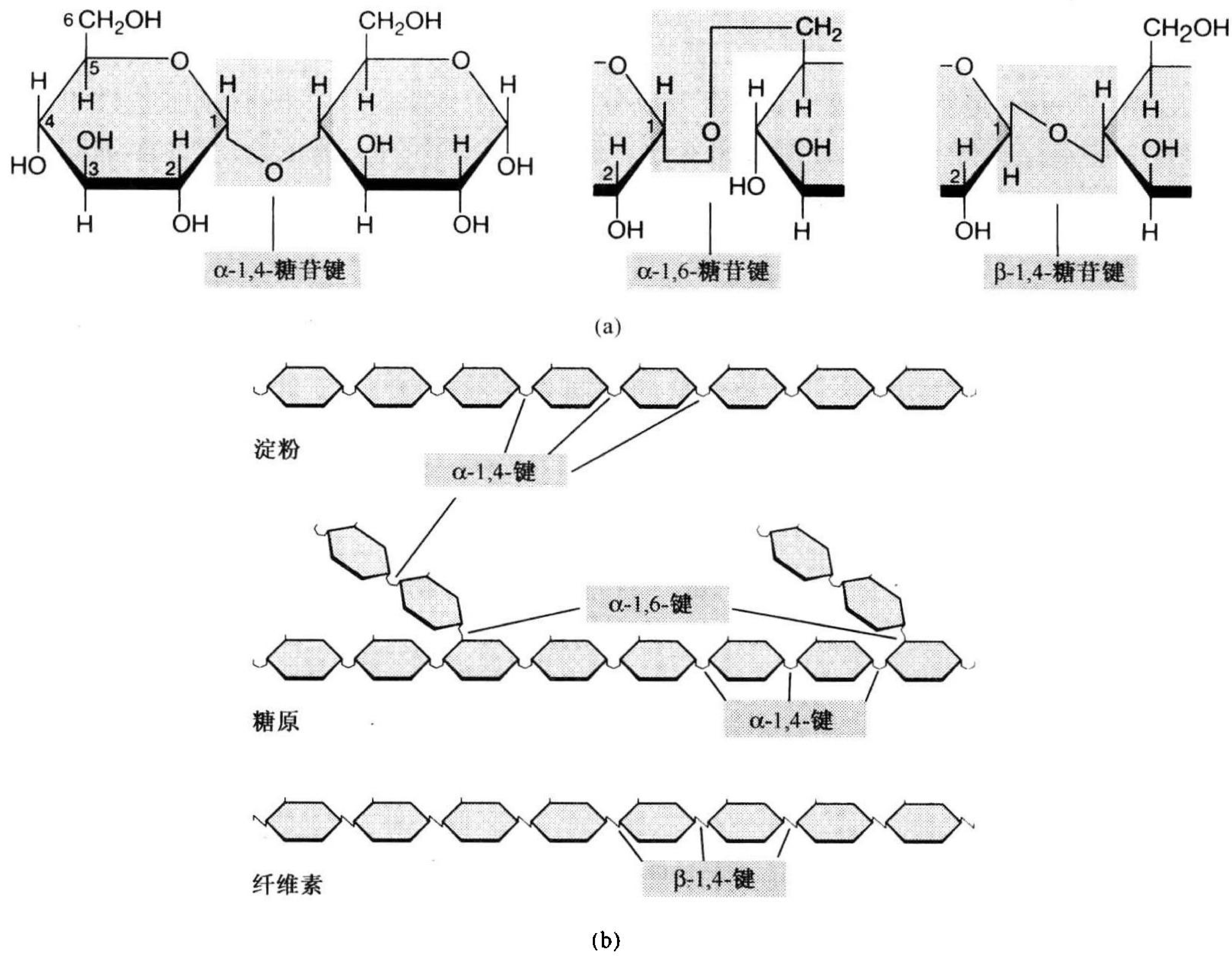


图 3.6　多糖。(a) 不同糖苷键的结构。注意：糖苷键的连接位点（与碳原子环的连接位点）和几何构型（α 或 β）都可以不同。(b) 一些常见多糖的结构。

碳和能源的储存物质。多糖的这种重复结构是葡萄糖单元 1 号碳和 4 号碳之间以 α 定向连接（如糖原和淀粉，图 3.6b）而形成的。相反，以 β-1，4-糖苷键连接的葡萄糖单元则存在于纤维素中（图 3.6b）。纤维素是坚硬植物和藻类的一种细胞壁组分。尽管淀粉和纤维素都由葡萄糖单元构成，但由于它们具有不同的糖苷键类型（α 或 β），因此它们的功能特征也不同。

多糖也能和其他类型的大分子结合，如与蛋白质和脂类结合形成复杂多糖——糖蛋白和糖脂。这些化合物在细胞膜中起重要作用，尤其是作为细胞表面的受体分子。这些化合物通常定位于与环境接触的细胞膜外表面。糖脂是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组分，因此也赋予这些生物体大量独特的表面特征（见 4.9 节）。

概念检查

糖结合成长链多聚物就叫多糖。连接糖基的糖苷键有两种不同的定位，赋予分子不同的特性。多糖也能结合其他分子，如与蛋白质和脂类形成复合多糖。

◆ *为何糖原和纤维素含有 100%葡萄糖，但却具有迥异的物理特征？*

3.4 脂类

脂类（lipid）是所有细胞的重要组成成分，且是两性大分子，既有亲水特性也有疏水特性。脂类结构随不同生命领域而变化，在同一个领域中，就已知有许多不同的脂类。脂肪酸是细菌和真菌脂类的主要成分。相反，古生菌的脂类主要由疏水性分子植烷构建（见 4.5 节）。

脂肪酸包括疏水性和亲水性成分。例如，软脂酸盐（软脂酸的离子形式，图 3.7）是一个 16 碳脂肪酸，它是由 15 个饱和（完全氢化和高度疏水）碳原子和一个羧酸基团（亲水部分）组成的链状结构。其他常见的细菌脂肪酸见图 3.7，包括从 C_{12} 至 C_{20} 饱和或单不饱和的形式。

甘油三酯和复合脂

单纯脂（脂肪）是脂肪酸和丙三醇（甘油）的键合物（图 3.7）。由于三个脂肪酸和甘油分子相连，所以单纯脂也被称作甘油三酯。

复合脂是含有附加元素或小分子亲水含碳化合物的单纯脂，这些元素可以是磷、氮或硫，这些亲水含碳小分子化合物可以是糖类、乙醇胺（图 3.7）、丝氨酸或胆碱。含有一个磷酸基团的脂类称为磷脂。磷脂是一类重要的复合脂，因为它是细胞膜的主要结构物质（见 4.5 节）。

脂类的两性特征使其成为细胞膜的理想结构组分。脂类聚集形成细胞膜。亲水（丙三醇）部分与细胞内部和外界环境接触，而疏水部分则埋藏在膜内（见 4.5 节和图 4.16）。该性质使膜成为理想的透性障碍。由于极性物质不能透过脂类的疏水区域，造成膜的不可透过性，从而阻止细胞质中的组分外流。当然，这也意味着极性物质是对细胞保持不外流的功能所必需，我们将在下一章阐述这个问题（见 4.5 节）。

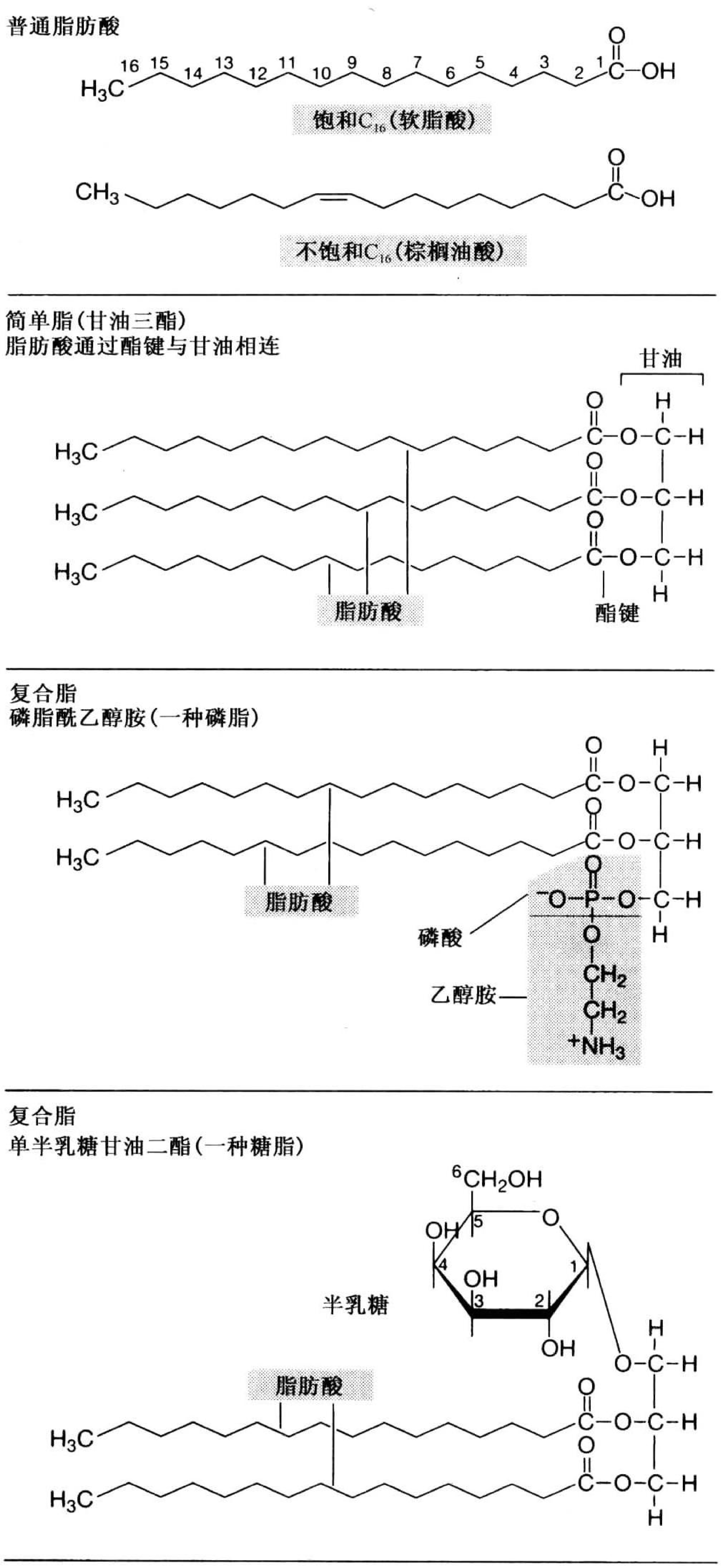


图 3.7　脂肪酸、简单脂（如脂肪）和复合脂。简单脂是由脂肪酸和甘油经脱水反应生成酯键而形成的。细胞中脂肪酸组成随生长温度而变化。

概念检查

脂类既含有疏水单元，又含有亲水单元；脂类的化学特征使其成为细胞膜的理想结构组分。

◆ 脂肪酸的哪部分是疏水的？哪部分是亲水的？

◆ 磷脂与甘油三酯的区别何在？

◆ 画出丁酸（一种 4 碳完全饱和脂肪酸）的化学结构。

Ⅲ 信息大分子

与多糖和脂类不同，核酸单体和蛋白质的序列携带遗传信息。因此，核酸和蛋白质属于信息大分子。

3.5 核酸

核酸包括脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA），它们是由核苷酸单体形成的大分子。因此，DNA 和 RNA 也都是多核苷酸（polynucleotide）。我们已经知道，DNA 携带细胞的遗传信息，RNA 则充当一种中间分子，它将遗传信息转变为蛋白质中特定的氨基酸序列（图 1.4）。

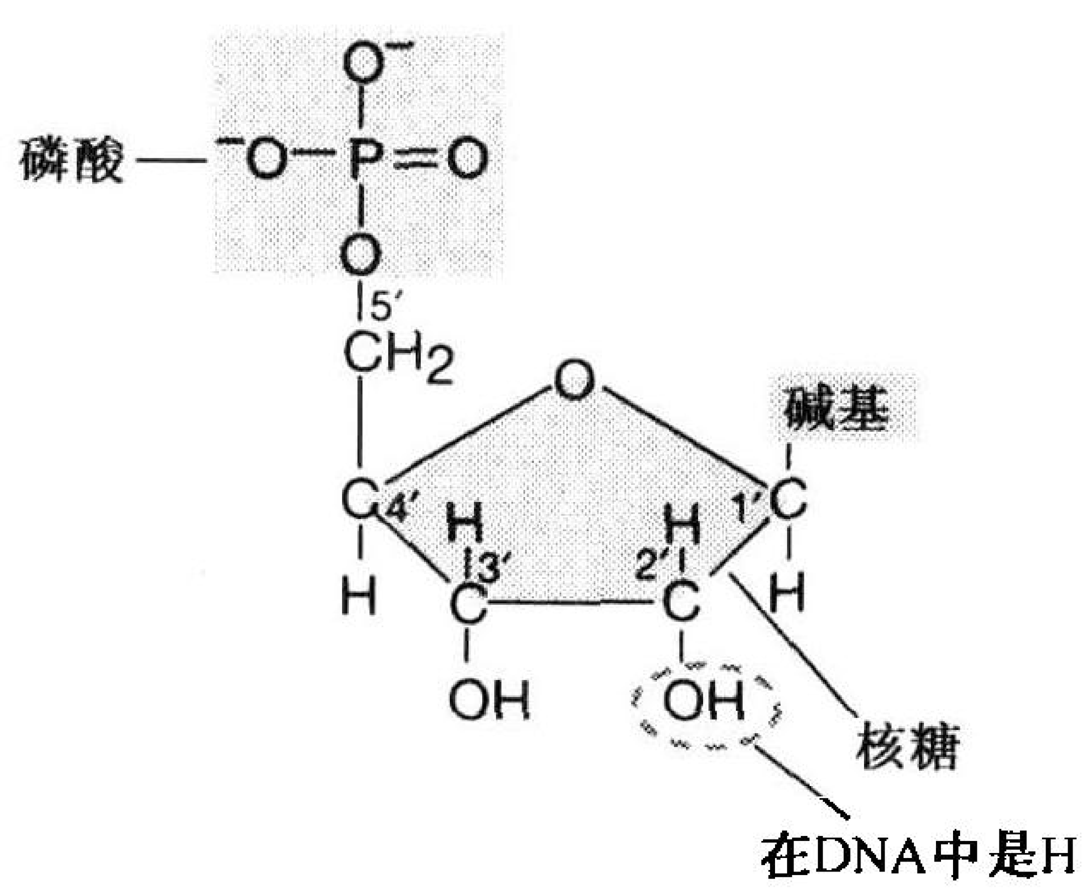


图 3.8 核苷酸。糖分子中的数字含有上标（′），是为了区别碱基中的环状结构，该结构用 1、2、3 等编号。

一个核苷酸由三种成分组成：1 分子五碳糖，核糖（RNA 中）或脱氧核（DNA 中）；1 分子含氮碱基和 1 分子磷酸 PO_4^{3-}。DNA 和 RNA 的主要结构非常相似（图 3.8）。

核苷酸

核酸的含氮碱基在化学分类上包括两种。一种是嘌呤碱，包括腺嘌呤（adenine）和鸟嘌呤（guanine），它是碳-氮组成的双杂环体（包含一个以上原子的环）；另一种是嘧啶碱，包括胸腺嘧啶（thymine）、胞嘧啶（cytosine）和尿嘧啶（uracil），它是碳-氮组成的六元杂环（图 3.9）。在 DNA 和 RNA 中都有鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶存在；胸腺嘧啶只存在（少数例外）于 DNA 中，尿嘧啶只存在于 RNA 中。

在核苷酸中，碱基通过糖苷键与戊糖相连，糖苷键的位置是在糖的 1 号碳原子与碱基的一个氮原子之间。在嘧啶碱中氮原子编号为 1，在嘌呤碱中氮原子编号为 9。如果没有磷酸参与，只是碱基与糖相连就叫做核苷。核苷酸则是含有一个或多个磷酸的核苷（图 3.10）。

核苷酸的主要功能是作为核酸的组分，此外还有一些其他功能。核苷酸，特别是腺嘌呤核苷三磷酸（ATP，图 3.10）是化学能量的关键来源，它在水解时打开一个磷酸

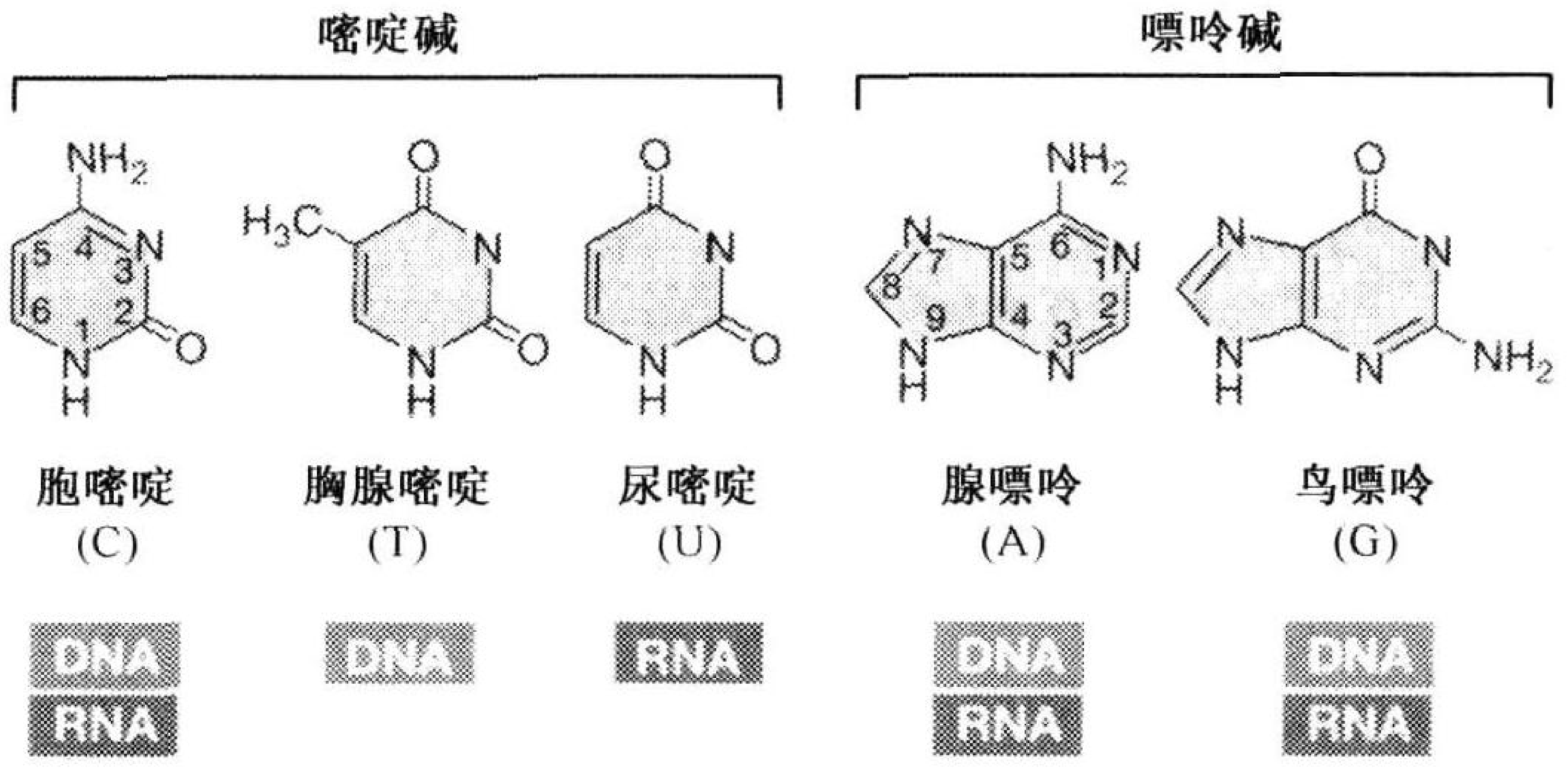


图 3.9 DNA 和 RNA 中的碱基结构。注意环中的编号系统。碱基与糖的碳 1 原子（图 3.8）连接，嘧啶碱通过 N-1 连接，嘌呤碱通过 N-9 连接。

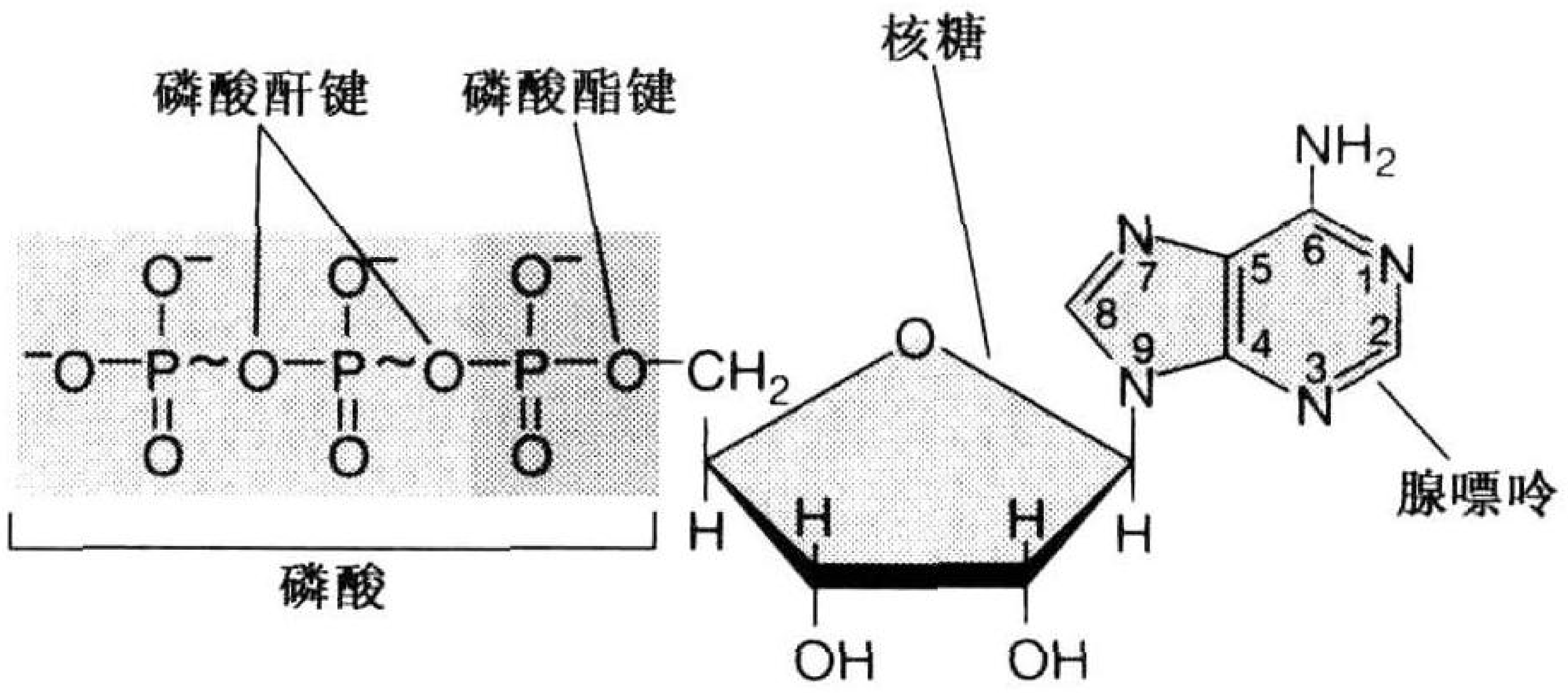


图 3.10 重要核苷酸（腺嘌呤核苷三磷酸）的组成。水解一个磷酸苷键（以曲线表示）释放的能量要比水解一个磷酸酯键释放的能量多，在第 5 章（见 5.8 节）我们将看到生物能学的重要性。腺苷（一种核苷）包括一个连接碱基的糖分子，但缺乏磷酸基。

键并释放出足够的能量以驱动细胞内的需能反应（见 5. 8 节）。其他核苷酸或核苷酸衍生物在细胞的氧化还原反应中能作为多糖生物合成中糖的携带物，并能作为调节分子来抑制或促进特定酶的活动及代谢反应。但这里我们只讨论核苷酸作为核酸结构单元的功能，也就是核苷酸主要的信息功能。

核酸

核酸的主链是一个以糖和磷酸分子交替连接而成的多聚体（图 3. 11)。多核苷酸是核苷酸的共价连接物，连接方式是从一个糖分子的 3 号碳原子（3′、3 是指原始编号）经磷酸与相邻糖分子的 5 号碳（ 5′）原子连接（图 3. 11a)。由于是一个磷酸分子经酯键连接到两个独立的糖分子上，所以这种磷酸连接方式就是化学上的磷酸二酯键（图 3. 11a)。

DNA 或 RNA 分子中的核苷酸序列是指分子的一级结构。正如我们所讨论过的，DNA 或 RNA 分子中的碱基序列具有信息性，编码蛋白质中氨基酸序列或编码特异的核糖体或转运 RNA。DNA 复制和 RNA 合成是细胞生命中的主要生命活动（见 1.2 节和图 1.4)。后面我们将看到，一个无差错机制对于保证遗传性状忠实地传至下一代是非常必要的（第 7 章)。

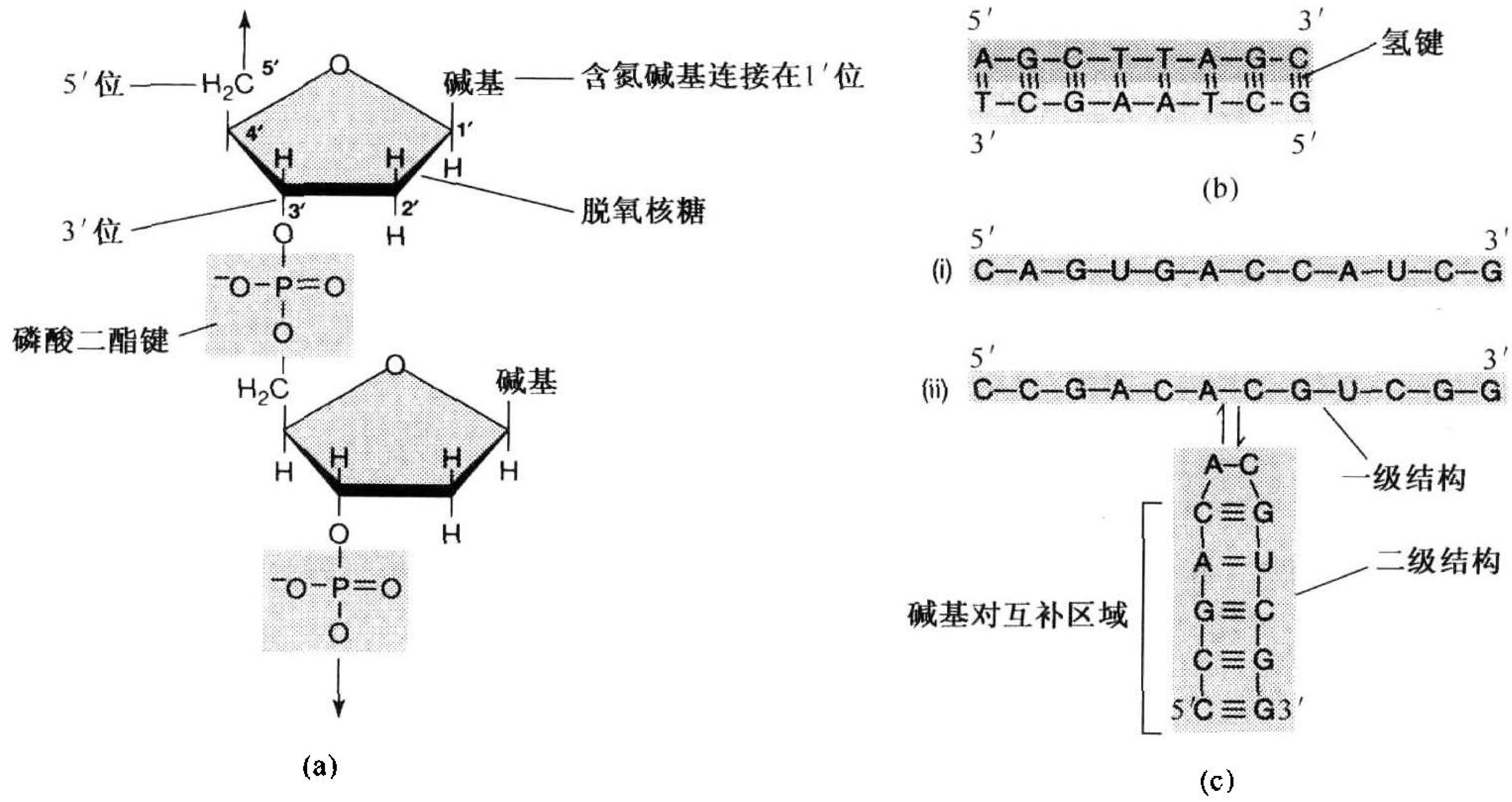


图 3.11 DNA 和 RNA。(a) DNA 链的部分结构。含氮碱基可以是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶。RNA 中，在 2′碳位置有 1 个羟基（图 3.8），而且尿嘧啶替代了胸腺嘧啶。(b) DNA 的简明结构，其中只显示出含氮碱基。注意，两条链的碱基序列是如何互补的（A=T，G≡C），以及两条链是如何以氢键连接的。(c) RNA：(i) 只显示一级结构的一段序列；(ii) 具有二级结构的一段序列。RNA 中，当链内碱基配对概率增加时形成二级结构。在某些非常大的 RNA 分子中，如核糖体 RNA（见 7.15 节和 11.5 节）中，分子的某些部分只含有一级结构，而其他部分既含有一级结构也含有二级结构。这可以导致形成高度折叠和旋转的分子（图 11.11c），其生物学功能依赖于最终的三维结构。

DNA

细胞中的 DNA 以双链形式存在。每个染色体都含有 2 条 DNA 链，每条链含数十万到数百万个经磷酸二酯键连接的核苷酸。这两条链之间以氢键连接，这些氢键是在两条链的核苷酸之间形成的。当嘌呤和嘧啶间的位置相互靠近时，它们就能形成氢键（图 3.2c）。

最稳定的氢键构型是鸟嘌呤（G）与胞嘧啶（C）之间形成的氢键及腺嘌呤（A）与胸腺嘧啶（T）之间形成的氢键（图 3.2c）。A 与 T 及 G 与 C 这种特定碱基对表示 DNA 的两条链在碱基序列上是互补的。也就是说，如果一条链上有一个 G，那么其互补链上必然有一个 C；如果一条链上有一个 T，那么其互补链上必然有一个 A（图 3.11b）。

RNA

除了少数例外，大部分核糖核酸是单链分子。但 RNA 分子能在其碱基互补区域自身折叠，形成折叠结构。在 RNA 中观察到的这种折叠方式就是它的二级结构（secondary structure）（图 3.11c）。

RNA 在细胞中有三项重要的功能。信使 RNA（messenger RNA，mRNA）含有 DNA 的遗传信息，它以与 DNA 部分碱基序列互补的单链 RNA 形式包含这些遗传信息。转运 RNA（transfer RNA，tRNA）是蛋白质合成的“受体”分子。tRNA 将来自核苷酸的信息传递给氨基酸（蛋白质的结构组分）。核糖体 RNA（ribosomal RNA，

rRNA）有几种类型，它是核糖体的重要结构和催化组分：核糖体是细胞内蛋白质的合成系统；这些不同的RNA分子将在第7章和第11章详细讨论。

概念检查

核酸的信息内容是由多核苷酸链上的碱基序列决定的。RNA和DNA都是信息大分子。RNA经常折叠成不同构型而形成二级结构。

- ◆ 核苷酸中都有哪些成分？
- ◆ 核苷与核苷酸有何不同？
- ◆ 区分RNA的一级结构和二级结构。

3.6 氨基酸和肽键

氨基酸是蛋白质（protein）的组成单体，多数氨基酸含有碳、氢、氧和氮，但在细胞内发现的21种常见氨基酸中，有2种还含有硫，有1种含有硒。所有氨基酸都含有两个重要的功能基团：一个是羧基（—COOH)，另一个是氨基（$—NH_2$）（表3.1和图3.12)。一个氨基酸羧基的碳原子和另一个氨基酸氨基的氮原子间形成一种称作肽键（peptide bond）的共价键（此过程失去1分子水）。肽键是蛋白质特有的共价键（图

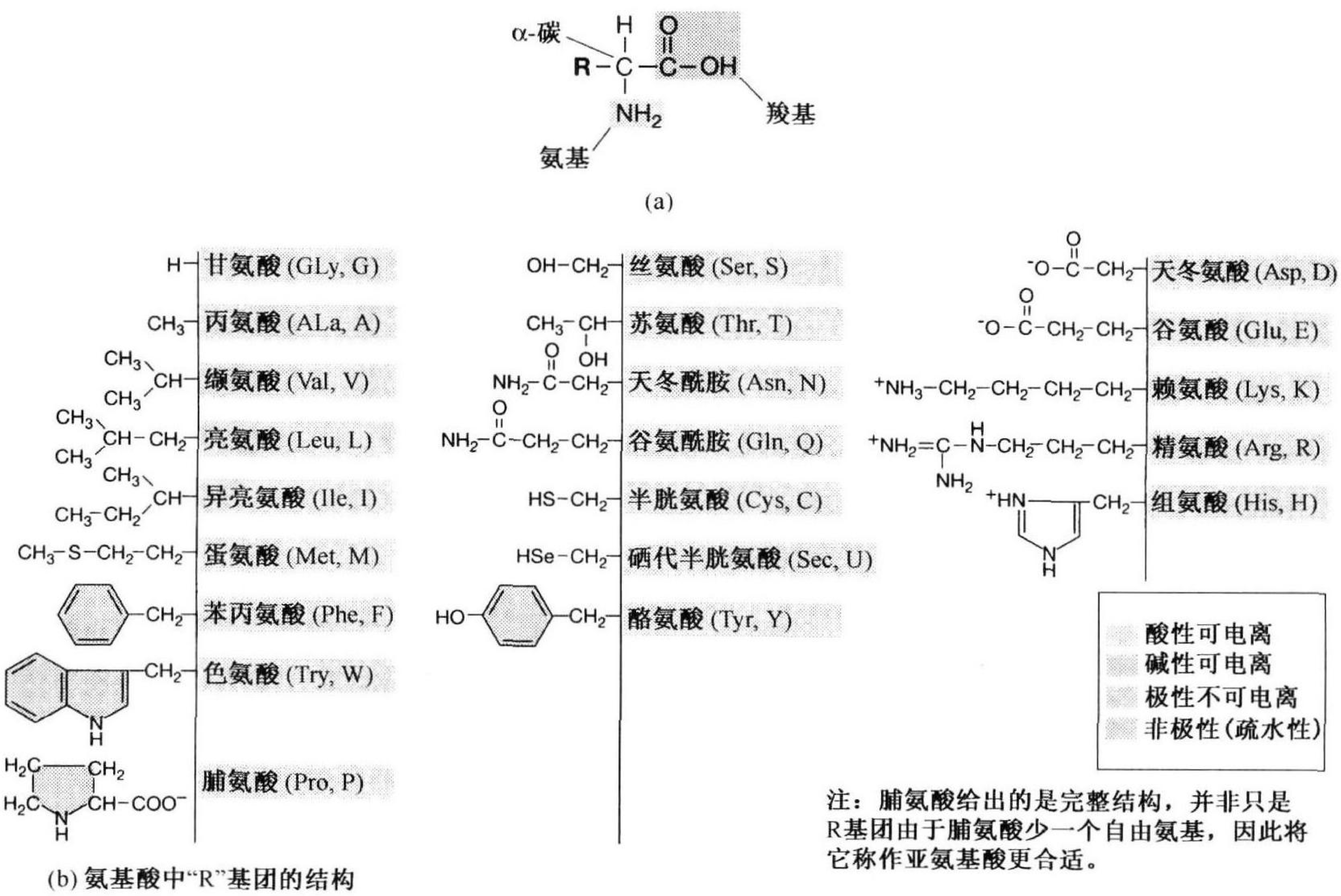


图3.12 21种常见氨基酸的结构。（a）氨基酸的一般结构。（b）R基团结构。氨基酸的字母表示法在左面，单字母表示法在右边。见第7章知识窗对第22种可能氨基酸的描述。

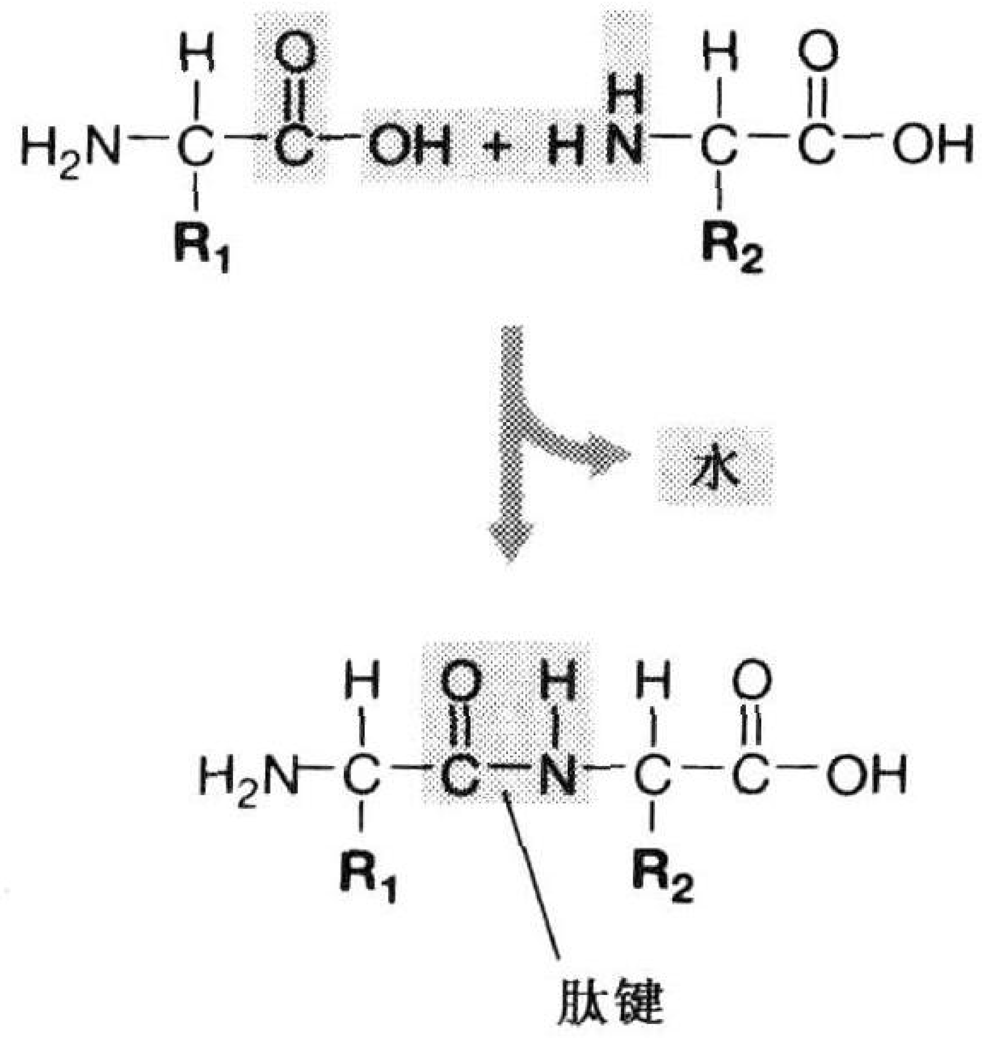


图 3.13　肽键的形成。R_1 和 R_2 代表氨基酸的可变部分（侧链）（图 3.12）。注意一个肽键形成之后，怎样出现为形成下一个肽键的自由羟基（图 7.38）。

3.13），因此氨基和羧基具有重要功能。

所有氨基酸都具有图 3.12a 所示的一般结构。此外，各氨基酸的区别在于碳原子相连的侧链基团（图 3.12 中简写为 R）的性质。α 碳是与羧基相距最近的碳原子。α 碳上的侧链结构变化较大，从甘氨酸中简单的氢原子到苯丙氨酸中的芳香环结构（图 3.12）。

氨基酸的化学性质在很大程度上是由侧链的化学性质决定的，因此，化学性质相似的氨基酸可归类到图 3.12 中的氨基酸“族”。例如，天冬氨酸和谷氨酸侧链本身含有一个羧基，它能提供氨基酸的酸性。侧链含有氨基的，则提供氨基酸的碱性。相反，几种氨基酸含有非极性侧链，可将它们归为非极性氨基酸。半胱氨酸含有一个巯基（—SH），该基团能够通过二硫键（R—S—S—R）连接两条氨基酸链。

由于细胞中存在多种不同性质的氨基酸，使得细胞中有可能产生大量生化特征迥异的蛋白质。例如，一个大肠杆菌（*Escherichia coli*）的细胞含有 2000 种不同的蛋白质（表 3.2），包括可溶性和膜结合酶、结构蛋白、转运蛋白和钙传感蛋白等。蛋白质的功能在很大程度上取决于其结构特征，反之亦然。具有特定功能的蛋白质经常表现为具有结构相关性。

同分异构体

具有相同分子式的两种分子能以不同的结构形式存在。这些相似却不相同的分子就是同分异构体（isomer）。著名的微生物学先驱者路易斯·巴斯德推翻了自然发生说（见 1.5 节），作为一个化学家，他开始了研究“光学异构体”的科学事业。巴斯德首先在酒石酸晶体中发现了不对称性，这奠定了后续研究的基础。此外，研究发现生物也可以产生光学活性分子（如氨基酸和糖类）。（某一种分子的晶体或纯溶液能将偏振光只向一个方向旋转，该分子即具有光学活性。）

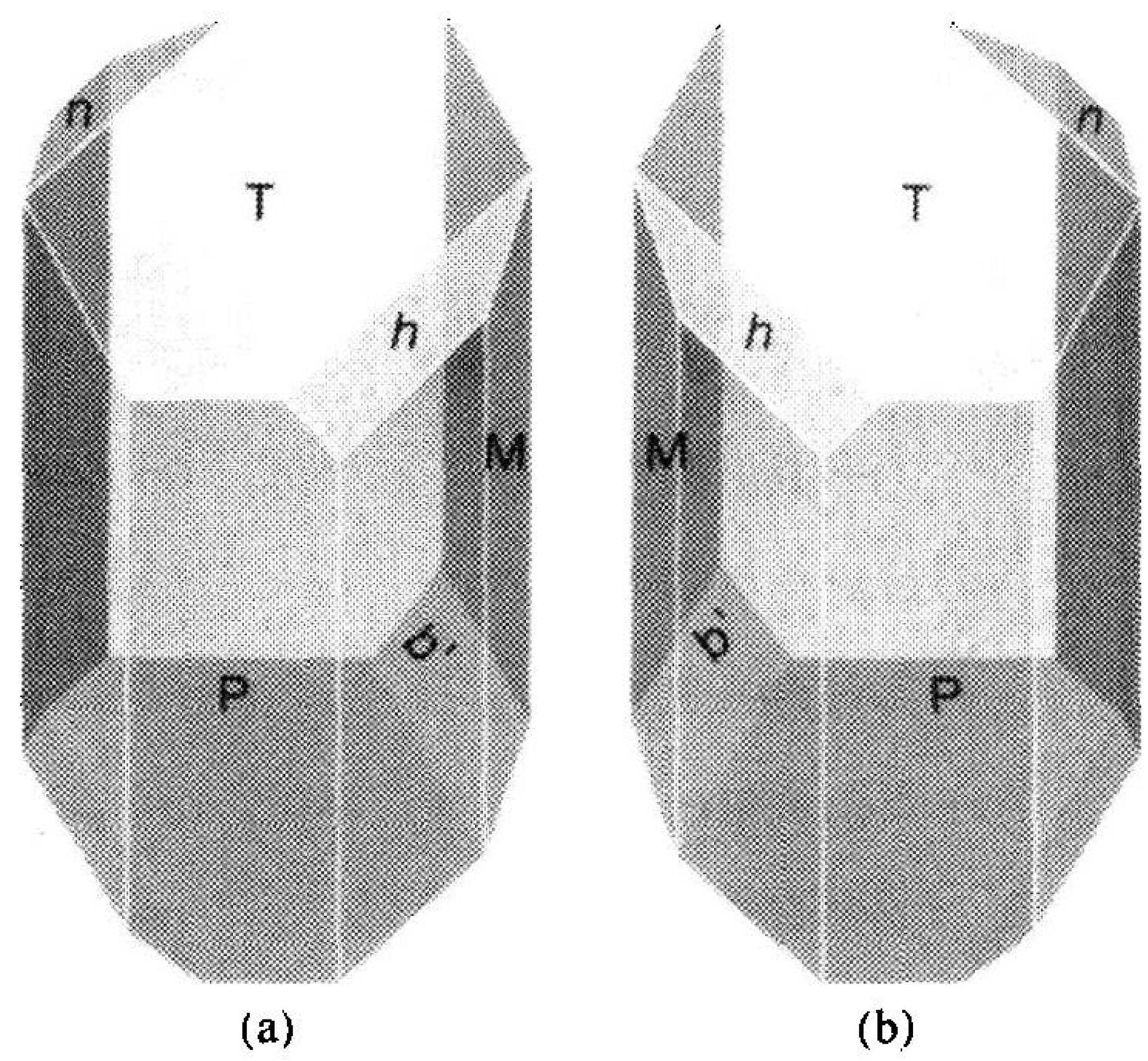


图 3.14　路易斯·巴斯德在其著名的光学活性论文中绘制的酒石酸（$C_4H_6O_6$）晶体结构图。(a) 左手晶型（L 型）。(b) 右手晶型（D 型）。注意这两种晶体是镜像结构（结构对映体）。晶体各切面的字母是巴斯德用来标示两个晶体互为镜像的各个切面的。添加颜色用来更清楚地展示各镜像切面。巴斯德继续指出曲霉菌只能代谢 D 型酒石酸盐，更坚定了他关于化学不对称性和生命具有联系的信念。

同分异构体在细胞结构中非常重要。例如，已发现许多常见糖的异构体是细菌和古生菌的细胞壁组分（见 4.8 节）。异构体具有相同的分子和结构式，只是其中的一个是另一个的镜像，就好比左手是右手的镜像一样，叫做对映异构体（enantiomer），并将其定为

D型和L型（图3.15b），其中D型糖在生物系统中占主导地位。

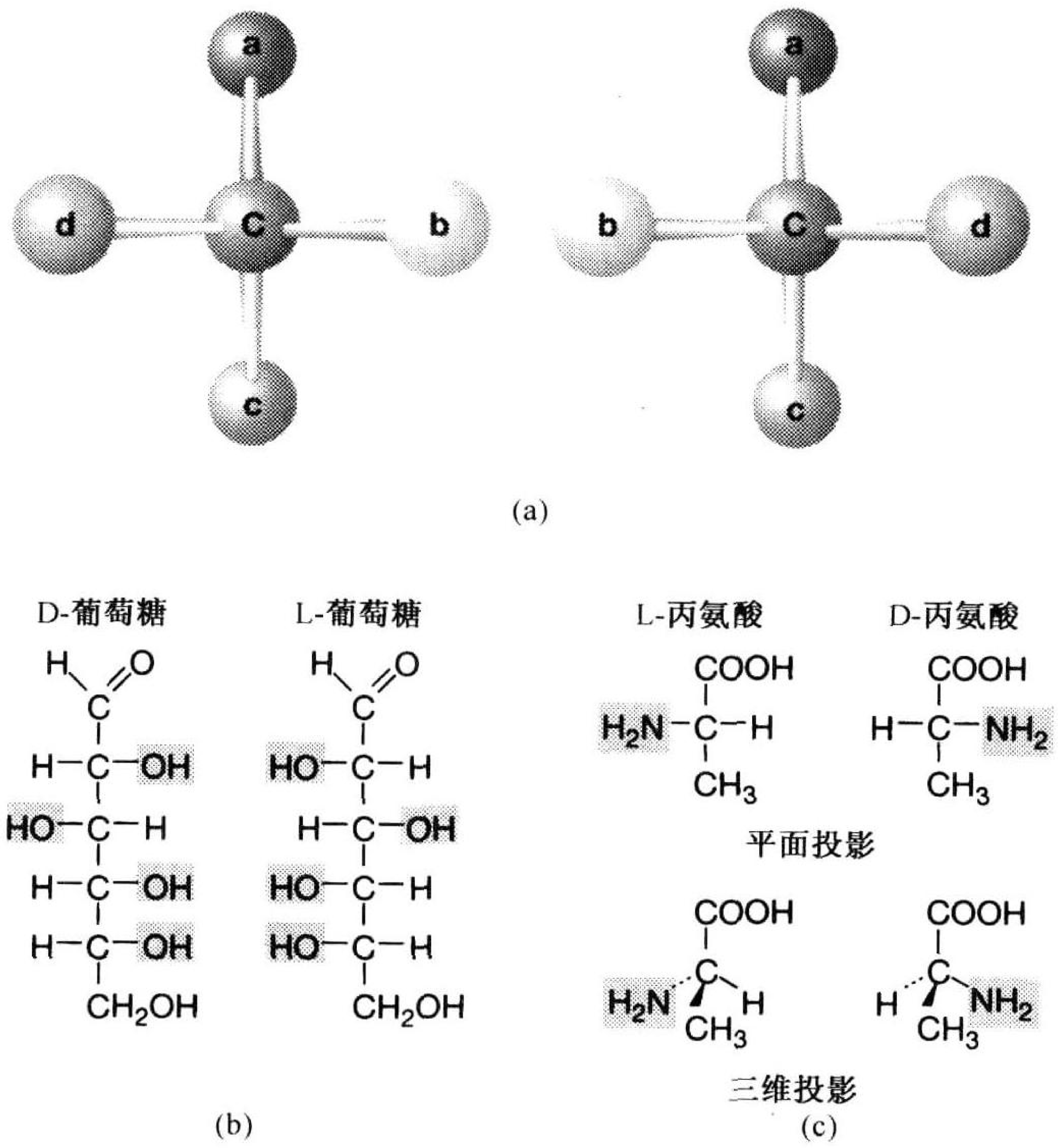


图3.15　异构体。（a）用球棍模型表示镜像对映体。（b）葡萄糖的结构对映体。（c）丙氨酸的结构对映体。注意，不管怎么旋转三维视角，L型和D型永远也不会重合。在三维投影中，箭头应理解为朝向我们的平面，而虚线则表示背向我们的平面。

氨基酸也存在D型或L型对映异构体。但生命已进化到倾向于利用L型氨基酸（图3.15c）。然而，自然界中也偶尔发现D型氨基酸的存在，特别是在细胞壁多聚物肽聚糖中（见4.8节）和在特定的肽类抗生素中（见20.9节）。细胞能够通过消旋酶的特异性催化实现异构体的互变。例如，一些原核生物能够利用L型糖或D型氨基酸，就是因为它们能够将这些分子形式转化成其相反的异构体类型。

概念检查

细胞中有21种常见氨基酸，彼此以肽键相连接。糖类和氨基酸存在镜像结构（结构对映体），但在大多数细胞多糖和蛋白质中只存在光学异构体。

- 为什么说氨基酸的结构相似却又不同？
- 画出由丙氨酸和酪氨酸组成的二肽的完整结构。标出肽键。
- 在生物体中通常能找到哪些糖和氨基酸的对映体形式？为什么甘氨酸没有结构对映体？

3.7 蛋白质：一级结构和二级结构

蛋白质在细胞行使功能中起着关键作用。实质上，细胞也就是因其所包含的大量蛋白质而称其为细胞，且行使其功能。因此，了解蛋白质结构对于认识细胞功能是非常重要的。

两种主要的蛋白质分别是催化蛋白（酶）和结构蛋白。酶（enzyme）是细胞中发生的各种化学反应的催化剂（第 5 章和第 17 章）。结构蛋白则是那些能成为细胞膜、细胞壁和细胞质中各结构组分的蛋白质。所有的结构蛋白都表现出特定的结构特征，我们现在对其进行讨论。

一级结构

蛋白质是氨基酸的多聚体，这些氨基酸之间以肽键共价相连（图 3.13）。两个氨基酸共价连接形成二肽，三个氨基酸共价连接形成三肽，以此类推。多个氨基酸经肽键共价连接形成多肽（polypeptide）。

蛋白质含有一个或几个多肽。不同蛋白质的氨基酸数目各不相同，已知的蛋白质含有少至 15 个多达 10 000 个氨基酸。由于各蛋白质的空间位置、序列和氨基酸数量有所不同，因此很容易看出蛋白质结构（及功能）上的巨大变化。

多肽中氨基酸的线性排列就是其一级结构（primary structure）；多肽的一级结构非常重要，因为一个给定的一级结构只与特定的折叠方式有关。而且只有最终得到折叠的多肽表现出生物活性。

二级结构

多肽氨基酸链上的 R 基团之间的相互作用促使多肽分子旋转并以特定的方式折叠，这一过程导致了蛋白质二级结构（secondary structure）的形成（图 3.16）。氢键是一种弱的非共价键（见 3.1 节），它在多肽的二级结构中发挥重要作用。α 螺旋是一种常见的二级结构。可将其想像为一个线性多肽缠绕在一个圆柱体上（图 3.16a）。在这种扭曲结构中，来自不同氨基酸的氢原子和氮原子的位置就会十分靠近以至于氢键的产生。这种形成氢键的可能赋予 α 螺旋内在稳定性（图 3.16a）。

一些多肽的一级结构可以形成另一种二级结构——β 折叠。在 β 折叠中多肽的氨基酸链自身前后折叠，并非形成螺旋。与 α 螺旋一样，这种折叠使氢原子暴露在外，从而可以形成氢键（图 3.16b）。通常，β 折叠产生较为坚硬的多肽，而 α 螺旋更加有弹性。因此，如果酶活性依赖于其弹性，则有可能该酶含有较高比例的 α 螺旋。反之，用来构建细胞骨架的结构蛋白有可能含有许多 β 折叠区域。

很多多肽既含有 α 螺旋又含有 β 折叠，折叠的类型由形成氢键和疏水相互作用的概率决定（图 3.17），这些结构区域就是结构域（domain），它是最终的蛋白质分子中具有特定功能的多肽片段。

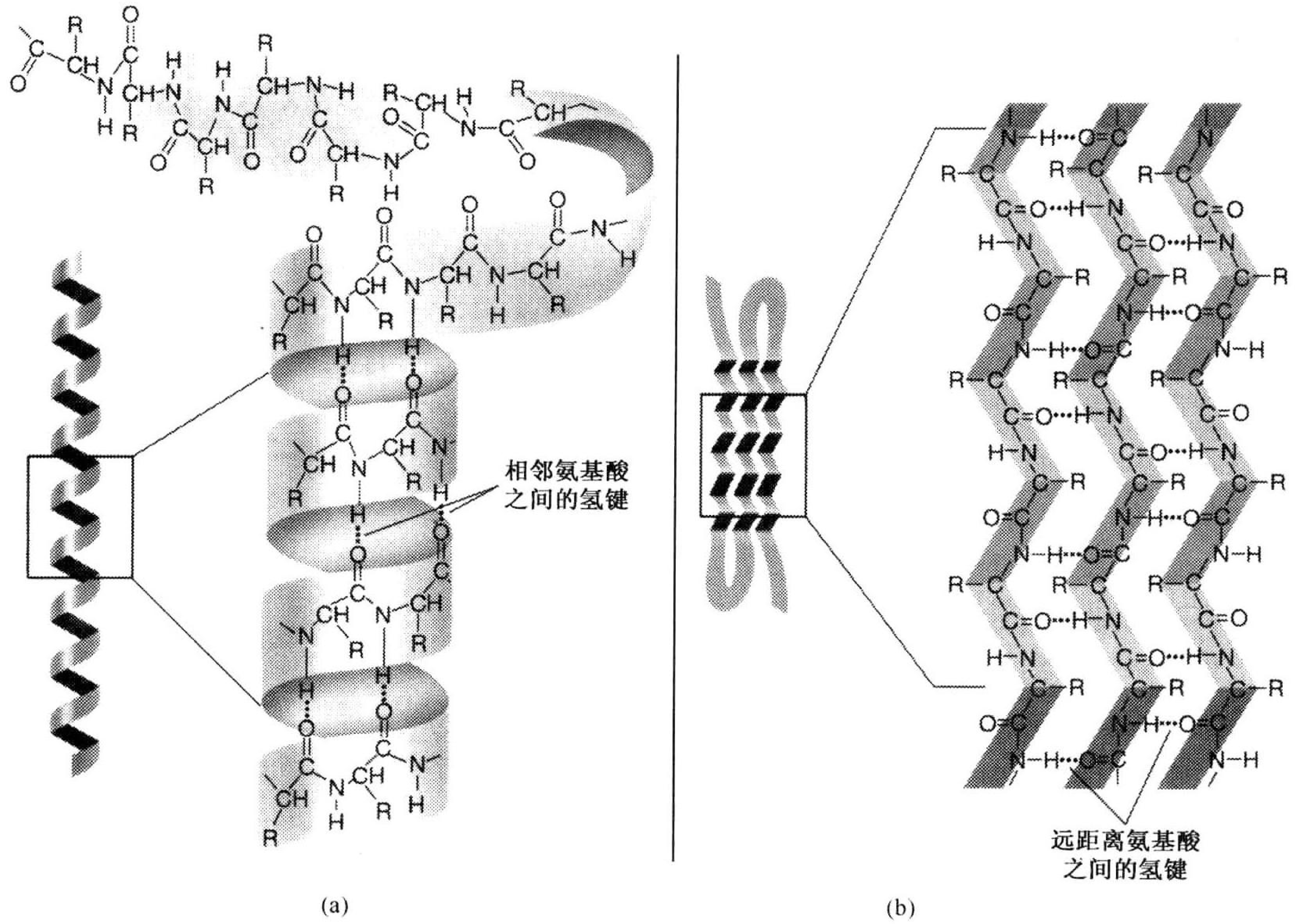
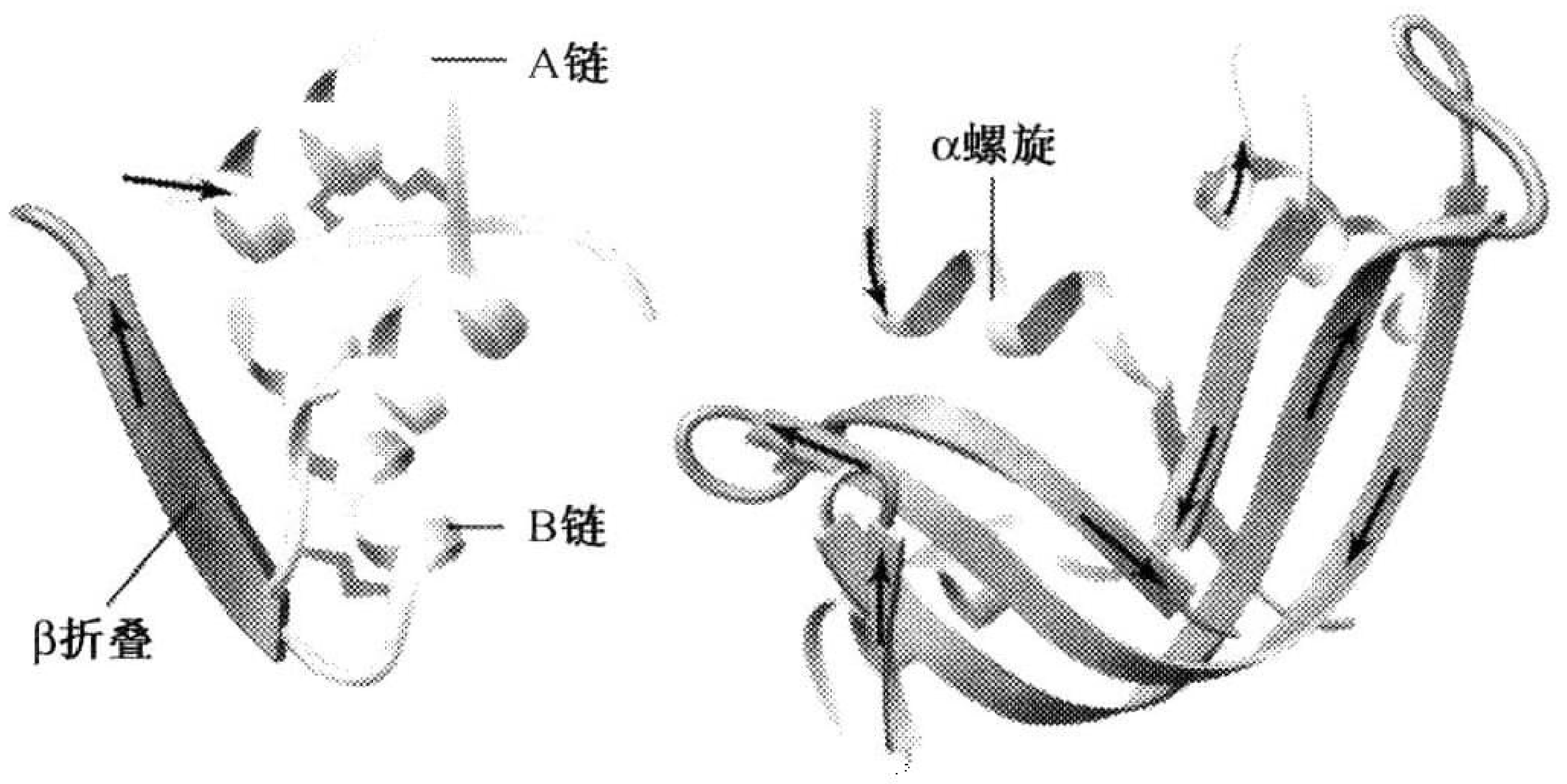


图 3.16　多肽的二级结构。（a）α 螺旋二级结构。注意氢键是在形成肽键的各原子间产生的，与 R 基团无关。（b）β 折叠二级结构。



(a) 胰岛素　　(b) 核糖核酸酶

图 3.17　具有 α 螺旋和 β 折叠二级结构的多肽的三级结构。（a）在胰岛素中，一个蛋白质分子包含两个多肽链（见 3.16 节）；注意 B 链怎样同时包含 α 螺旋和 β 折叠二级结构，二硫键（蓝色表示）如何指导折叠类型（三级结构）。（b）核糖核酸酶，具有几个 α 螺旋和 β 折叠二级结构区域的巨大蛋白分子。

3.8 蛋白质：高度有序结构与变性

一旦某个多肽形成了二级结构，它自身会继续折叠形成一个更稳定的分子。这种折叠形成一个独特的三维形状，叫做蛋白质的三级结构。

与二级结构相似，三级结构（tertiary structure）归根结底也是由一级结构决定的。三级结构在一定程度上还受二级结构的影响，因为多肽氨基酸侧链以特定方式进行排列（图 3.16a），如果能形成另外的氢键、共价键、疏水相互作用或其他原子间相互作用，多肽便会顺应这些化学键或各种相互作用进行折叠（图 3.17）。

多肽经常以下述方式进行折叠，即折叠后使邻近的半胱氨酸残基的巯基（—SH）暴露在外。这些自由—SH 能在两个氨基酸之间共价结合形成二硫键。如果两个半胱氨酸残基定位在蛋白质的不同多肽链中，二硫键就会将两个分子连接起来（图 3.17a）。另外，如果单一的两个半胱氨酸残基在分子内部形成一个二硫键，该多肽就会自发折叠并与其自身共价结合。

如果一个蛋白质含有两个或两个以上的多肽（而且许多蛋白质确实如此），那么所有这些多肽亚基就形成了最终的蛋白质分子，这样的蛋白质分子就是蛋白质的四级结构（quaternary structure）（图 3.18）。在具有四级结构的蛋白质中，每一个多肽（亚基）都含有一级、二级和三级结构。一些具有四级结构的蛋白质含有许多相同的亚基。含有两个相同亚基的蛋白质叫做同型二聚体。另有一些蛋白质含有几个不同亚基；每个亚基有一个或数个拷贝（如异型二聚体，包含两个不同多肽，每个多肽各有一个拷贝）。多亚基蛋白质的各亚基间彼此以非共价键相互作用（氢键、范德华力或疏水相互作用）或以共价键（通常是亚基间二硫键）聚集在一起。

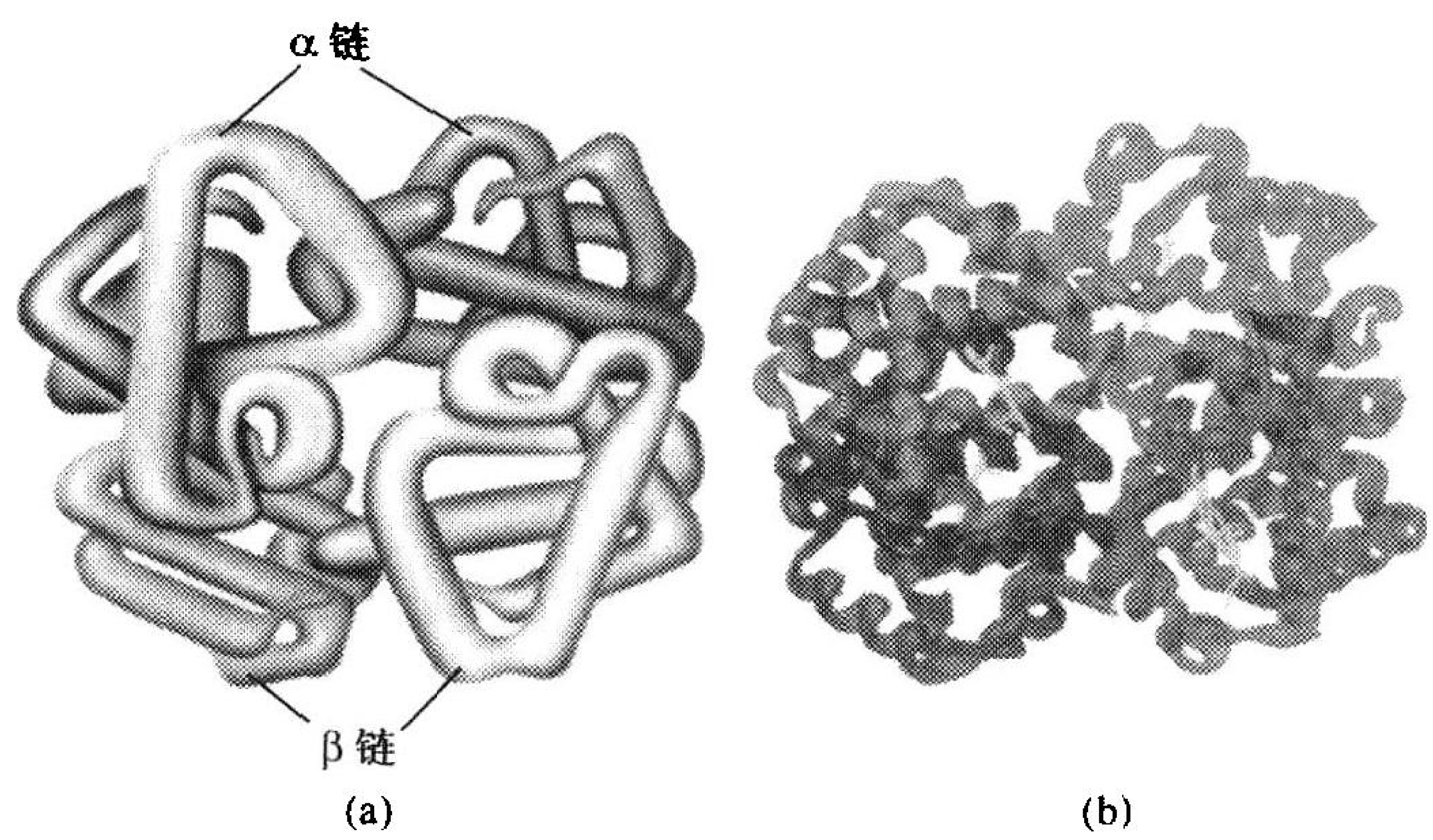


图 3.18　人血红蛋白的四级结构。（a）血红蛋白中有两种多肽，α 链（用蓝色和红色表示）和 β 链（用橙色和黄色表示），在最终的蛋白质分子中有四条多肽（α 和 β 在此代表链的名字，而非多肽的二级结构）。不同的颜色用来区分四种不同的多肽链。（b）用 X 射线结晶学方法来确定人血红蛋白的分子结构。每条链用不同的颜色表示。

变性

高温、酸碱、某些化学物质或金属离子能影响蛋白质的折叠特性。当蛋白质暴露在上述条件下时，它就会发生变性（denaturation）（图 3. 19）。变性导致多肽链解折叠，并破坏了分子的高级结构（一级、二级和三级结构）。多肽的重新折叠依赖于变性条件的严重程度，将变性剂去除，就可能使多肽重新发生折叠（图 3. 19）。

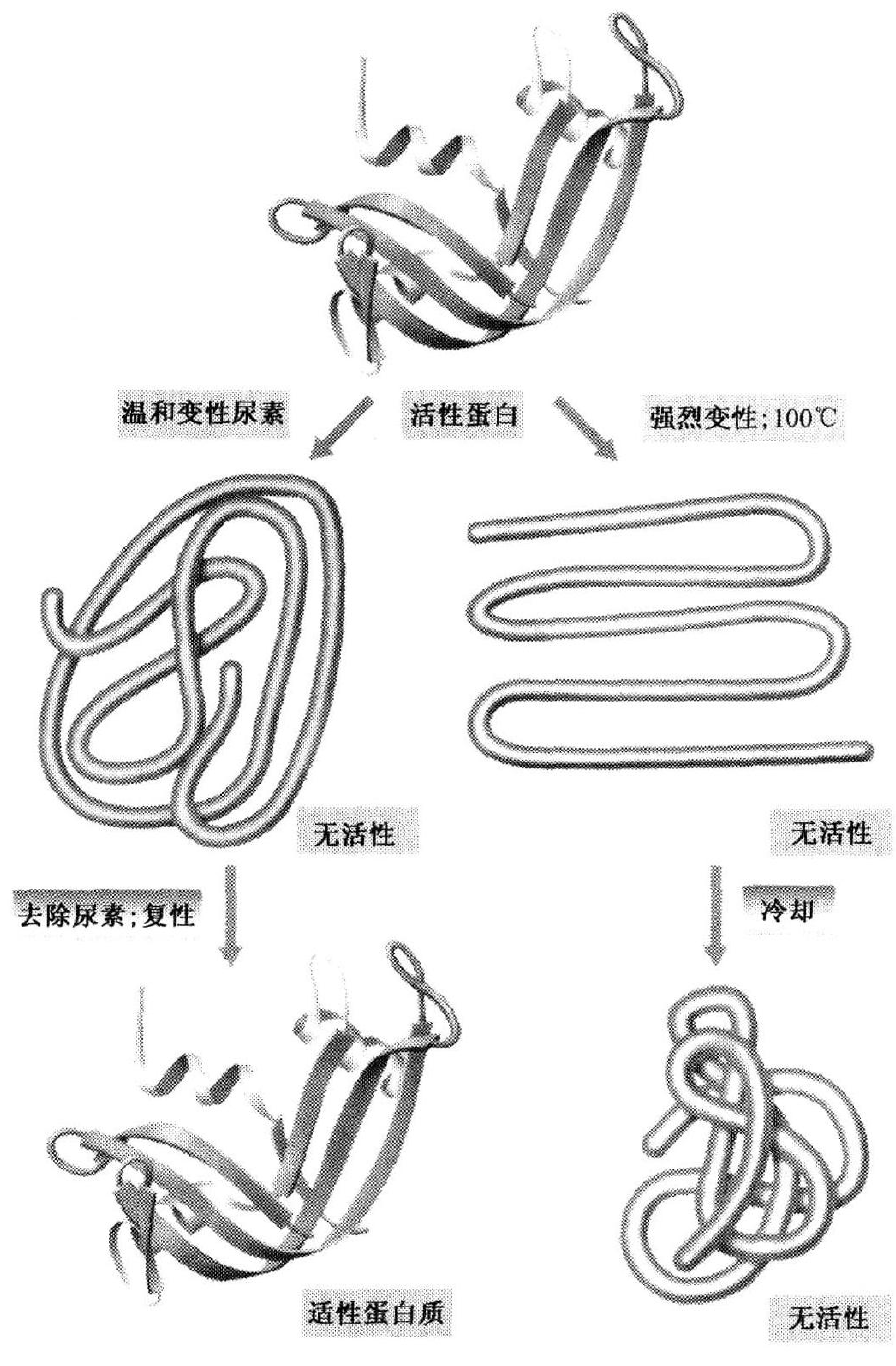


图 3. 19 核糖核酸酶的变性。核糖核酸酶的分子结构在图 3. 17b 中讨论过。注意由于强烈变性发生不正确的折叠，通常产生永久性破坏的分子（从生物学功能角度看）。

变性通常伴随蛋白质生物活性的丧失。由于肽键（图 3. 13）不受影响，所以变性分子仍保持自身的一级结构。这表明生物活性与蛋白质的一级结构并非有着完全必然的联系，但生物活性确实是蛋白质分子特异折叠的结果，而这种折叠归根结底是由一级结构决定的。换言之，多肽的折叠使之获得了与特定生物学功能相一致的独特形状。

蛋白质变性不只是具有理论意义，该过程是杀死微生物的主要手段。例如，苯酚和乙醇是有效的消毒剂，就是由于它们可以进入微生物细胞并使其蛋白质发生不可逆的变性。类似的化学试剂可以用于非生命体的表面消毒，并在家庭、医院和工业消毒剂应用中具有广泛的实际用途（第 20 章）。

前景

我们已经回顾了生命化学，可以更好地理解细胞的结构学关系。下一章我们将学习不同的大分子如何一起构成细胞的主要结构，包括细胞膜、细胞壁和鞭毛。在此基础上，我们将在第 5 章讨论细胞的代谢特征。代谢（细胞的机器功能）驱动大分子的生物合成与装配（细胞的编码功能）（见 1.2 节和图 1.4）。这些过程结合起来导致细胞生长（第 6 章）。细胞生长形成细胞群体，若干细胞群体形成微生物群落。在群落水平上，微生物在其生存环境产生主要的生态学影响。

当我们通读该书时，有必要经常回顾第 3 章，以加强有关生命化学的基本原理。尽管微生物已演变出无数种化学多样性大分子，但这些大分子都可以简化分为本章所讨论的四种类型。许多成功的微生物学家认为，对于蛋白质、脂类、核酸和多糖的生化性质的理解非常重要，且对掌握基本和高级微生物学原理有很大帮助。

概念检查

蛋白质的一级结构由氨基酸序列决定，但决定细胞中蛋白质功能的是多肽的折叠（高级结构）。

- 以蛋白质结构为参考，定义一级结构、二级结构和三级结构。
- 多肽与蛋白质有何不同？
- 哪些二级结构特性使得 β 折叠比 α 螺旋更坚硬？
- 描述同源四聚体蛋白中多肽的数量与种类。
- 描述变性对蛋白质的结构与生物学影响。蛋白质变性有什么实际应用价值？

复习题

1. 生物体中发现的重要元素有哪些？为何生物体中富含氢和氧？（见 3.1 节）
2. 为“分子”一词下定义。氢气分子中有多少个原子？葡萄糖分子中有多少个原子？（见 3.1 节和 3.3 节）
3. 参见图 3.1 所示胞嘧啶的结构。画出这一结构并标出胞嘧啶分子中所有单键和双键的位置。
4. 比较“单体”和“多聚体”两词的含义。举出生物学中三种重要的多聚体并列出它们分别由哪种单位组成。哪种大分子在细胞中含量（按重量）最丰富？（见 3.1 节和 3.2 节）
5. 列举简单脂类的组成成分。甘油三酯与复合酯有哪些区别？（见 3.4 节）
6. 参见图 3.7 所示甘油三酯与磷脂酰乙醇胺的结构。磷酸和乙醇胺取代脂肪酸如何改

变脂类的化学性质？（见 3.4 节）

7. RNA 和 DNA 是相似的大分子物质，但它们具有本质的区别。列举 RNA 与 DNA 在化学和物理学上的三种区别。DNA 和 RNA 的细胞功能分别是什么？（见 3.5 节）
8. 为何将氨基酸如此定名？写出氨基酸的一般结构。在最终的蛋白质结构中 R 基团有何重要性？为何半胱氨酸对蛋白质结构有着不同寻常的意义？（见 3.6 节）
9. 两个氨基酸之间发生的何类化学反应将导致肽键的形成？（见 3.6 节）
10. 定义蛋白质的一级、二级、三级和四级结构。其中哪些结构受变性过程的影响？（见 3.7 节和 3.8 节）
11. 填空。糖苷键对于________，相当于________键对于多肽、________键对于核酸。所有这些键都是________键，比其他弱键，比如________、________和________化学结合得更牢固。（第 3 章）

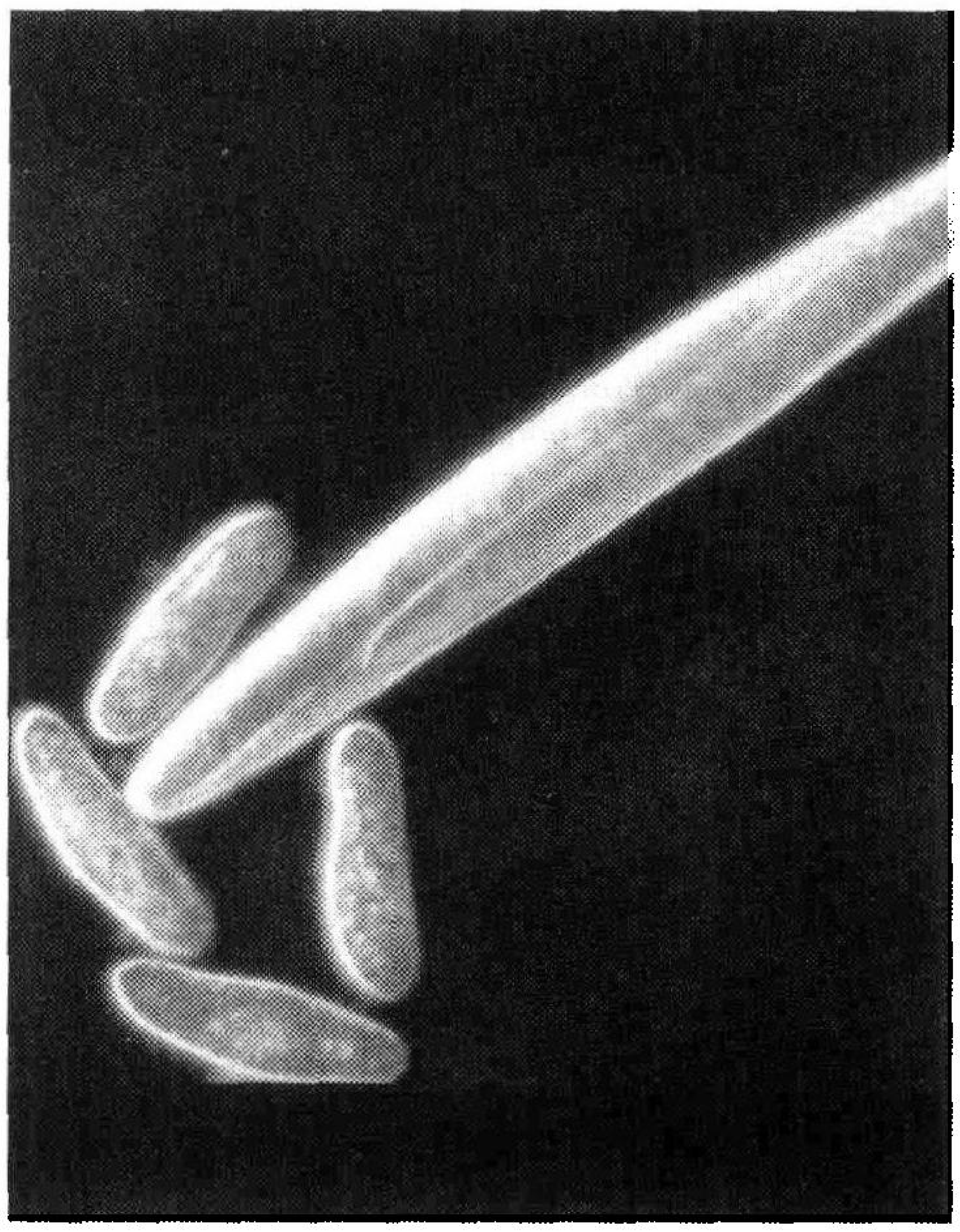
应用题

1. 观察下列 RNA 的核苷酸序列：(a) GUCAAAGAC，(b) ACGAUAACC。这两个 RNA 分子是否都有二级结构？如果有，画出可能的二级结构图。
2. 少数可溶性（细胞质）蛋白含有大量的疏水氨基酸。你怎样预测这些蛋白质折叠成的三级结构？为何有此预测？
3. 盐杆菌属（*Halobacterium*）是生活在高盐环境中的一种古生菌，其 K^+ 含量超过 5mol/L。由于含有大量的 K^+，盐杆菌的许多细胞质蛋白富含两种特定的氨基酸。这两种氨基酸在盐杆菌蛋白中的含量远远大于其在大肠杆菌（*Escherichia coli*）的相似功能蛋白中的含量（大肠杆菌细胞质中 K^+ 浓度极低）。盐杆菌蛋白中富含的是哪两种氨基酸？为什么？提示：哪些氨基酸能最好地中和源于 K^+ 的正电荷？
4. 当将大肠杆菌（*Escherichia coli*，人类肠道寄生菌）培养物放入装有沸水的烧杯中，细胞会立即发生明显的变化。而当将 *Pyrodictium*（热网菌属，一类超嗜热微生物，生长于沸腾的热泉中）培养物放入同样的烧杯中，不会发生相似的变化。请解释原因。
5. 参见图 3.6b，指出这些聚合物的不同之处。如果将聚合物中所有的糖苷键水解，剩下什么单体分子？
6. 参见图 3.12b，在所列出的全部氨基酸中，是哪些化学特性使其被归为一类？

（宋存江　译，李国强　校）

4

细胞结构与功能



原核生物细胞的典型特征是非常小，但有时也很大。图中所示的是原核生物 *Epulopiscium* 细胞的显微照片，其旁边是真核生物草履虫（*Paramecium*）的 4 个细胞。

词汇表

ATP 结合盒式转运蛋白［ATP-binding cassette（ABC） transporter］：由 3 种蛋白质组成的膜转运系统，其中一种蛋白质水解 ATP 运输特异的营养物进入细胞

荚膜（capsule）：存在于某些细菌最外层的多糖或蛋白质，通常非常黏滑

趋化性（chemotaxis）：生物体直接朝向或背向化学浓度梯度的运动

细胞质膜（cytoplasmic membrane）：细胞具有的渗透性的屏障，可使细胞质与周围环境分隔开

内生孢子（endospore）：由某些革兰氏阳性菌产生的一种高度抗热、厚壁的分化结构

鞭毛（flagellum）：原核生物中一个长而细的细胞附加体，对细胞的旋转与运动起作用

气泡（gas vesicle）：细胞质内充满气体的结构，结合有蛋白质，可使细胞具有浮力

革兰氏阴性菌（Gram-negative）：一种原核细胞。细菌细胞壁含有较少的肽聚糖，且具有细胞外膜。由脂多糖、脂蛋白和其他一些复杂的大分子组成

革兰氏阳性菌（Gram-positive）：一种原核细胞。细菌细胞壁主要由肽聚糖构成，缺少革兰氏阴性细胞那样的外膜

基团转位（group translocation）：一种需能运输过程。在此过程中，被运输的物质在运输过程中被化学修饰

脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）：在革兰氏阴性菌中，与多糖和蛋白质结合的脂质，是共同组成外膜的主要部分

磁小体（magnetosome）：在趋磁细菌细胞质中，由磁性微粒（Fe_3O_4）组成的无单位膜包围的结构

形态学（morphology）：指类似于杆状、球状、螺旋状的细胞形状

外膜（outer membrane）：由磷脂和多糖组成的单位膜，位于革兰氏阴性菌肽聚糖层的外面

肽聚糖（peptidoglycan）：由乙酰葡萄糖胺与乙酰胞壁酸相间重复组成的多糖，层与层之间由乙酰胞壁酸上的短肽交联联结

周质（periplasm）：革兰氏阴性菌细胞质膜的外膜与脂多糖层的内膜之间的胶状区域

周生的（peritrichous）：鞭毛生长模式，即围绕细胞表面的许多地方分布有鞭毛

趋光性（phototaxis）：生物体的向光运动

极生的（polar）：根据鞭毛生长，在细胞的一端或两端生有鞭毛

聚 β-羟丁酸（poly-β-hydroxybutyrate，PHB）：原核细胞中一种普遍的储藏物质，是由 β-羟丁酸或其他 β-链烷酸或混合的 β-链烷酸组成的多聚体

原生质体（protoplast）：一种去除细胞壁的渗透性保护的细胞

分辨率（resolution）：区分和分离两种物体的能力

S 层（S-layer）：存在于某些细菌和古生菌细胞表面的最外层，由蛋白质或糖蛋白组成

固醇（sterol）：疏水的杂环分子，可增加真核细胞和少数原核生物细胞质膜的强度

Ⅰ 显微镜检术和细胞形态学

第 2 章我们介绍了原核和真核细胞的概念。在这一章，我们主要讲述原核细胞的结构，而真核细胞结构将留到第 14 章讨论。

所有细胞，如细菌、古生菌和真核生物细胞的基本结构在许多方面是一样的。细胞，如同房子一样，是由各种材料连接起来并建成较复杂的结构。由单体组合成大分

子，然后这些大分子形成了具有特定功能的复合体结构——核糖体、膜、细胞壁等。尽管我们看到这些大分子在化学上有较大差异，但是细胞都面临着相似的结构问题和用相同的方式解决这些问题。

我们以显微镜检术开始这章的讨论，然后分别讲述细胞膜、细胞壁、细胞表面结构、内含物及微生物的运动。我们开始于显微镜检术是因为，不仅从历史上看，显微镜最早揭开了细胞结构的秘密，而且甚至在今天它仍然是微生物学研究中的重要工具。

4.1 光学显微镜检术

观察微生物需要利用光学显微镜（light microscope）或电子显微镜（electron microscope）。一般来讲，光学显微镜用于在低放大率下观察完整细胞，而电子显微镜则用于观察内部的细胞结构或细胞表面的细微结构。

所有的显微镜都是采用透镜放大细胞影像，使它的细微结构变得清楚。但是除了放大率（magnification），还有分辨率（resolution）的概念，即区分和分离两个邻近物体的能力。虽然放大率能无限的提高，但分辨率却不行，它由光的物理特性决定，所以是分辨率，而不是放大率，最终决定着我们用显微镜所能够看到的生物体大小。

我们首先讨论光学显微镜，它的分辨率极限约是 0.2μm（200nm），然后再讲电子显微镜，它的分辨率是光学显微镜的 1000 倍，能够观察单个的分子。

复式光学显微镜

光学显微镜采用可见光照射细胞结构。普遍用于微生物学中的光学显微镜有：明视野（bright-field）、相差（phase-contrast）、暗视野（dark-field）和荧光（fluorescence）。

利用明视野显微镜（bright-field microscope），即通过对样本和其周围介质的差异进行比较来观察样本。这种差异是由于细胞吸收和分散的程度不同而产生的。光学显微镜在生物学和微生物学实验课程中应用最广泛，它由两个透镜组成（物镜和目镜），其功能是共同显示影像（图 4.1）。许多细菌细胞用明视野显微镜很难看清楚，是因为它们缺少与周围介质的对比，但是染了色的生物体除外，因为生物体的颜色加强了对比效果，所以提高了细胞的可视性（图 4.2）。

放大率和分辨率

复式显微镜的总放大率是其目镜和物镜放大率的乘积（图 4.1b）。1500 倍的放大率是复式光学显微镜的最高极限，超过这个极限，分辨率不能提高。分辨率取决于光的波长和物镜的数值孔径（用于衡量聚光能力）。总的说来，透镜的放大率及数值孔径之间有某种联系：透镜的放大倍数越高，它的数值孔径也越高（透镜的数值孔径与放大率并排标在透镜上）。可分辨物质的最小直径等于 0.5λ/数值孔径，λ 为光的波长。从这个公式可以看出，当用蓝光照射样本，同时使用具有较大数值孔径的物镜时，分辨率最高。

如前所述，复式光学显微镜最高分辨率约为 0.2μm，这就意味着两个物体间距小于 0.2μm 时不能分辨出来。微生物学中所用的大多数显微镜，目镜的放大倍数为

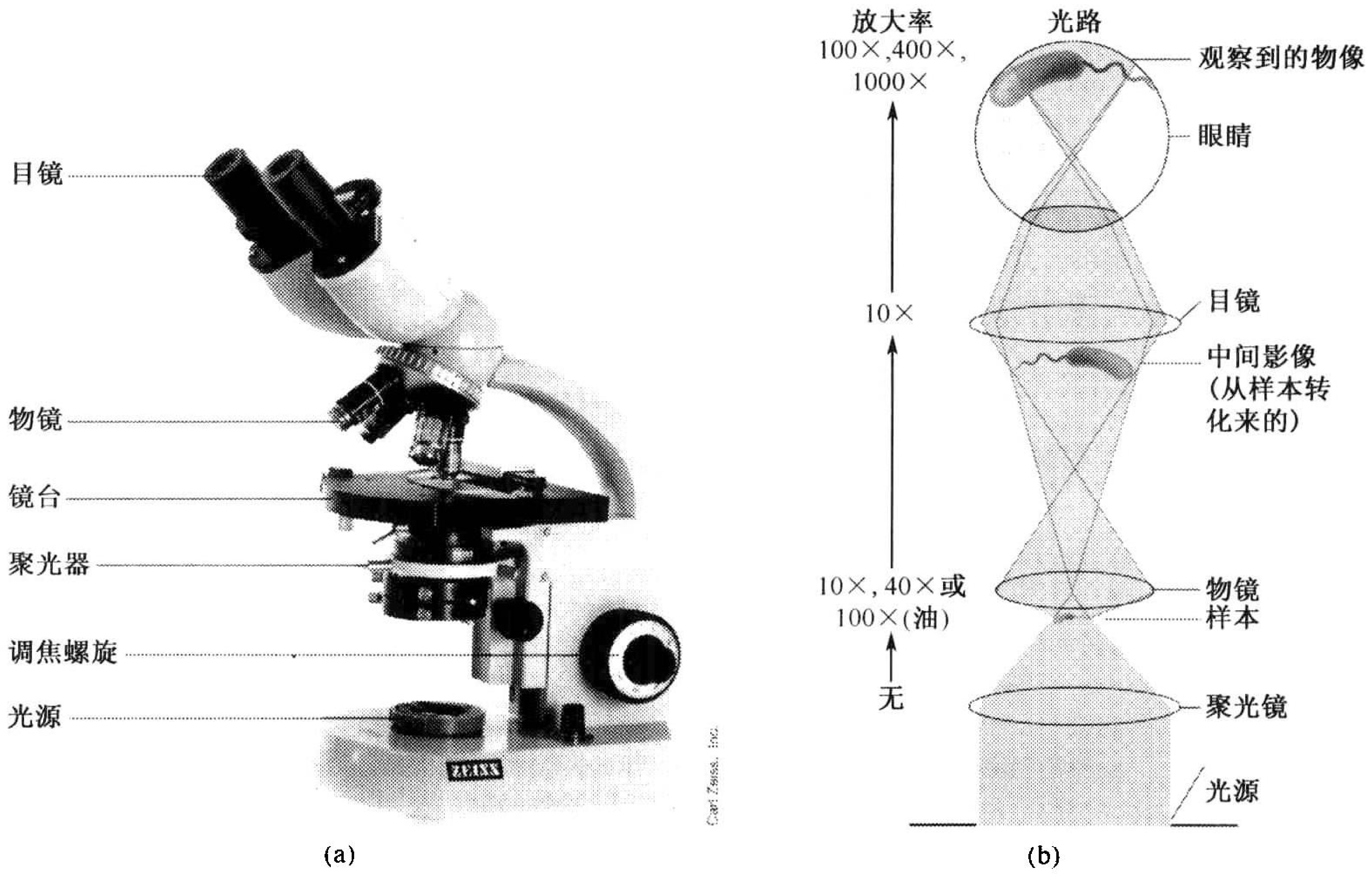


图 4.1　显微镜检术。(a) 复式光学显微镜，显微镜的主要部分已标出。(b) 通过复式光学显微镜的光路图。目镜除了 10 倍的，还有 15～30 倍的。

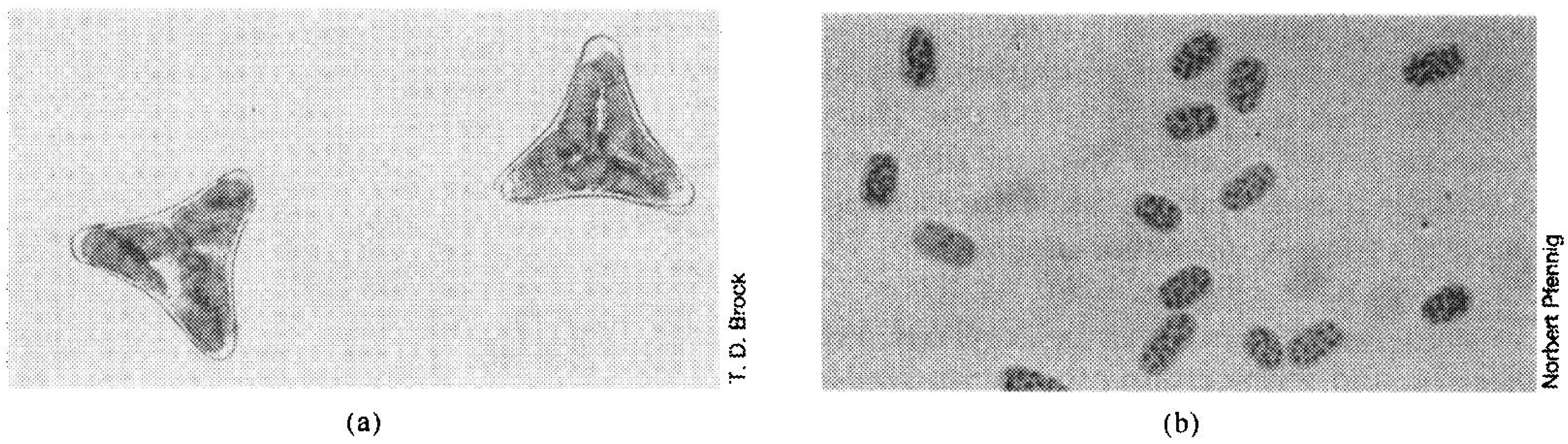


图 4.2　明视野显微镜下着色微生物体的显微照片。(a) 绿藻（真核生物）。(b) 紫色光养细菌（原核生物）。藻类细胞直径大约为 15μm，细菌细胞直径为 5μm。

10×～15×，物镜为 10×～100×（图 4.1b）；在放大 1000×时，直径为 0.2μm 的物体刚好可以分辨出来。用 100×物镜或某种具有较高数值孔径的其他物镜时，可在物体与物镜之间使用一种高纯度的光学用油，使用油的透镜称为油浸透镜（oil-immersion lens），油镜增加了来自不同角度样本光线的透镜的聚光能力，否则物镜就会失去收集和观察的作用。

染色：提高明视野显微镜检术的对比效果

明视野显微镜检术的局限性之一是缺乏对比度，可以用染料对细胞进行染色，以提高细胞的对比效果，从而能更容易地在明视野显微镜下观察到细胞。染料是有机化合物，每一种染料都与某种特定细胞物质有一种亲和性。微生物学中应用的染料带有正电

荷（碱性染料），能牢固结合带负电荷的细胞成分，如核酸和酸性多糖。碱性染料包括亚甲蓝（methylene blue）、结晶紫（crystal violet）和番红（safranin），因为细胞表面趋向于带负电荷，这些染料可以高亲和性地与细胞表面的结构结合，所以是非常好的通用的染色试剂。

单染（simple stain）一般使用细胞悬液干燥制备法（图 4.3）。一载玻片上含有热固定细胞后的干悬液，用染料的稀释液浸泡 1～2min，然后用水冲洗几遍，风干。通常用高倍镜（油镜）观察细菌的干染色样本（图 4.3）。

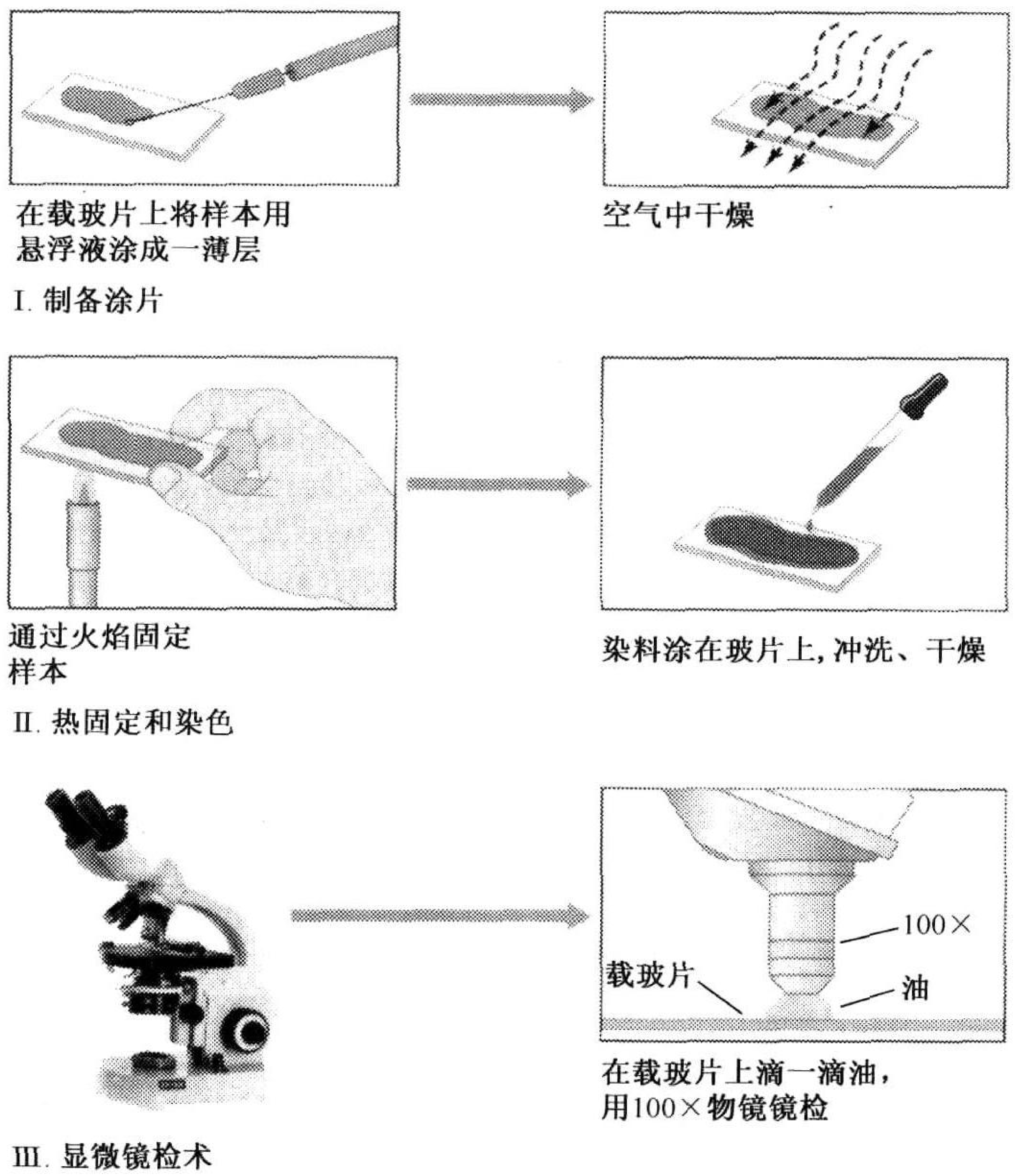


图 4.3 用于显微镜观察的染色细胞。染色提高了细胞与背景之间的对比效果。

鉴别染色：革兰氏染色

之所以称为鉴别染色（differential stain），是因为该方法不能将所有类型的细胞染成相同的颜色。在微生物学中广泛应用的一种重要的鉴别染色法是革兰氏染色（Gram stain）（图 4.4a）。根据对革兰氏染色的反应不同，可以把细菌分为两大类：革兰氏阴性菌（Gram-negative）和革兰氏阳性菌（Gram-positive）。经过革兰氏染色后，革兰氏阳性菌表现为紫色而革兰氏阴性菌表现为红色（图 4.4b）。这种差别是因为这两类细菌的细胞壁结构不同（这章的后面会讨论），从而导致乙醇使革兰氏阴性菌脱色，而不能使革兰氏阳性菌脱色（图 4.4）。

革兰氏染色是微生物学研究中最有用的染色方法之一，尤其是在研究一种新细菌的

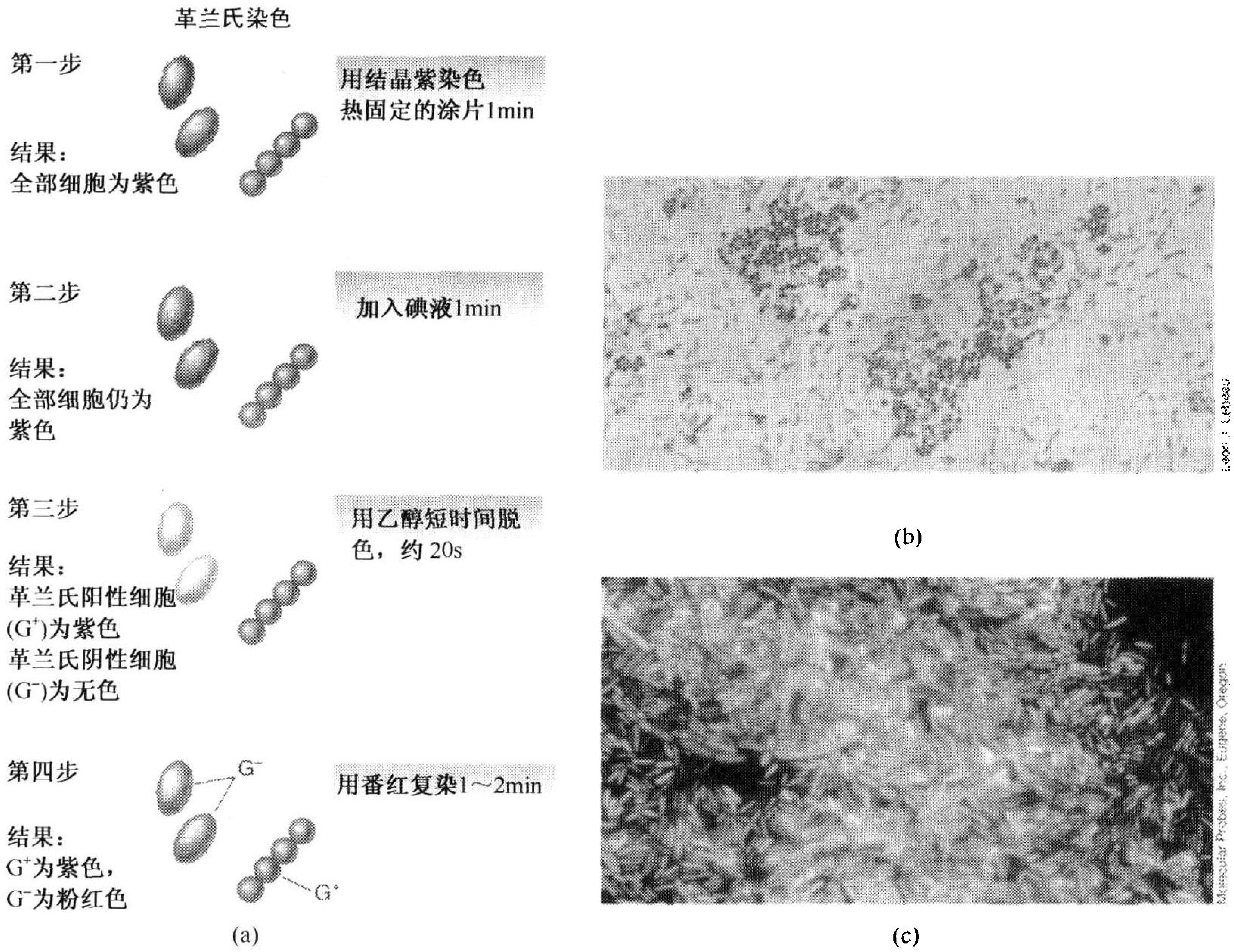


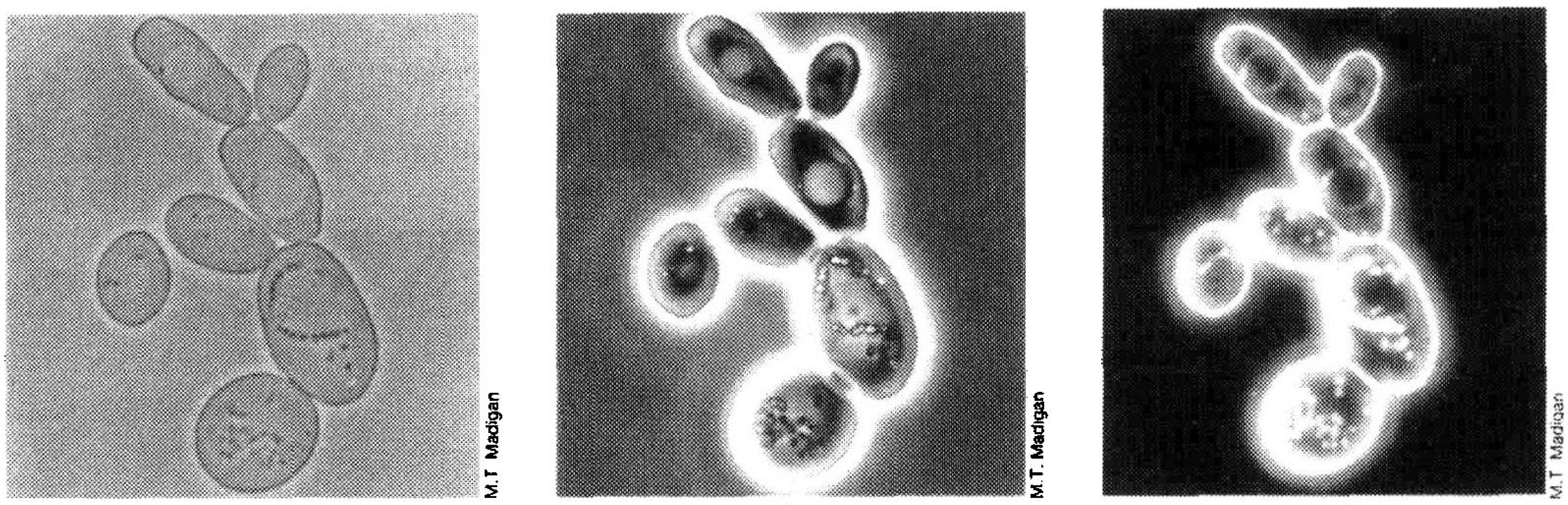
图 4.4　革兰氏染色。（a）革兰氏染色方法的步骤。（b）革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌显微照片。分别是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和大肠杆菌（*Escherichia coli*）。（c）利用一步荧光染色法染色的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*，G^- 菌，绿色）和蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*，G^+ 菌，橙色）显微照片。该方法仅用一步染色就能将革兰氏阳性菌从革兰氏阴性菌中鉴别出来。

特性时，首先要确定该菌株是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌。如果有荧光显微镜（见后面荧光显微镜检术的讨论），革兰氏染色可以简化为一步程序，因为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌发出不同颜色的荧光（图 4.4c）。

相差、暗视野和荧光显微镜检术

相差显微镜（phase-contrast microscope）可以用来提高细胞与其周围介质的对比差别，从而不需要染色就能观察到细胞（图 4.5）。相差显微镜之所以被广泛用于科学研究中，是因为它可以较容易地观察生活状态的细胞。虽然染色是光学显微镜检术中普遍使用的方法，但该法会杀死细胞，并且改变了细胞原有的一些特征。

1936 年，荷兰的数学物理学家 Frits Zernike 发明了相差显微镜检术，其原理是细胞减慢了光线穿过它们的速度，因此细胞及其周围环境有不同的折射率，从而造成细胞本身与其周围环境之间相位的不同，而这种微小的差异可通过相差显微镜物镜上的一个特殊的环得以扩大，导致在一个亮的背景下形成一个暗的物像（图 4.5b）。这个环由相



(a) (b) (c)

图 4.5 用不同类型的光学显微镜在同一条件下拍摄的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）显微照片。（a）明视野。（b）相差。（c）暗视野。细胞直径平均为 8～10μm。

差板组成，是 Zernike 的主要发明，它可以扩大在相位上的细微变化。Zernike 发明的细胞与背景之间不同的反差也促进了后来在显微镜检术方面的改革，如荧光和聚焦显微镜检术（见后面），类似于相差，不同反差形成了该技术的核心。由于相差显微镜检术的发明，Zernike 获得了 1953 年的诺贝尔物理学奖。

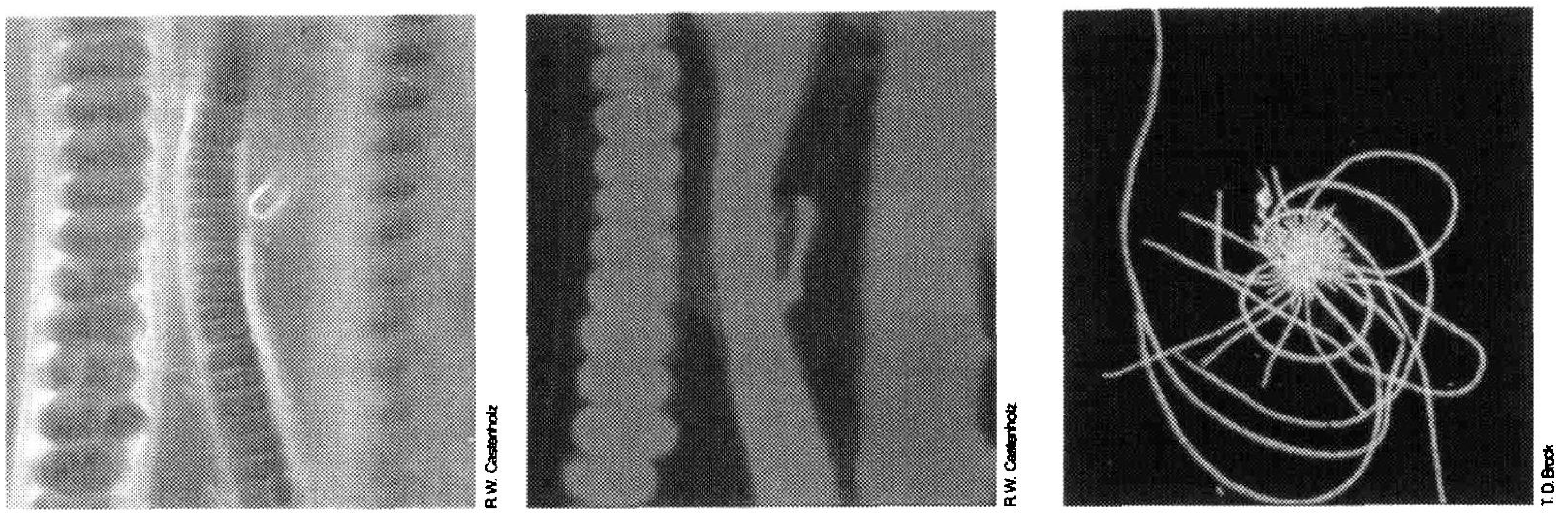
暗视野显微镜（dark-field microscope）是一种普通的光学显微镜，它的聚光系统已加以改造，使投射到标本上的光线来自侧面，因而看到光线的仅仅是被标本散射的光，这样，标本在一个暗背景下显现亮的物像（图 4.5c）。暗视野显微镜检术分辨率比光学显微镜检术稍微好些，因此，那些在明视野和相差显微镜下不能分辨的物质常常可以在暗视野显微镜下得以分辨。暗视野显微镜检术也是观察微生物运动很好的手段，鞭毛束常用这种方法进行分辨（图 4.55a）。

荧光显微镜（fluorescence microscope）用于观察能发荧光的标本，也就是说，当一种颜色的光照到它时，它会放出另一种颜色的光（图 4.6）。荧光的产生或是因为细胞内本身存在荧光物质，如叶绿素或其他的荧光组分（自身荧光）（图 4.6a、b），或是因为细胞经过了荧光染料处理（图 4.4c 和图 4.6c）。DAPI（二脒基-2-苯吲哚）是一种广泛使用的荧光染料，将细胞染成亮蓝色（图 18.6），应用 DAPI，细胞可以在复杂的环境中（如土壤、水、食品或临床标本）被鉴定出来（见 18.3 节）。荧光显微镜广泛用于临床诊断微生物学和微生物生态学（见第 18～20 章和第 24 章）。

概念检查

显微镜对微生物学研究是必需的。有不同类型的光学显微镜，包括明视野、暗视野、相差和荧光显微镜。在明视野显微镜检术中，需要用染色来提高反差效果。

- ◆ 分辨率的定义是什么？
- ◆ 光学显微镜放大率的最高限度是多少？
- ◆ 什么样的光学显微技术可以提高分辨率？
- ◆ 革兰氏阴性菌采用传统的方法经革兰氏染色后是什么颜色？



(a)　　　　(b)　　　　(c)

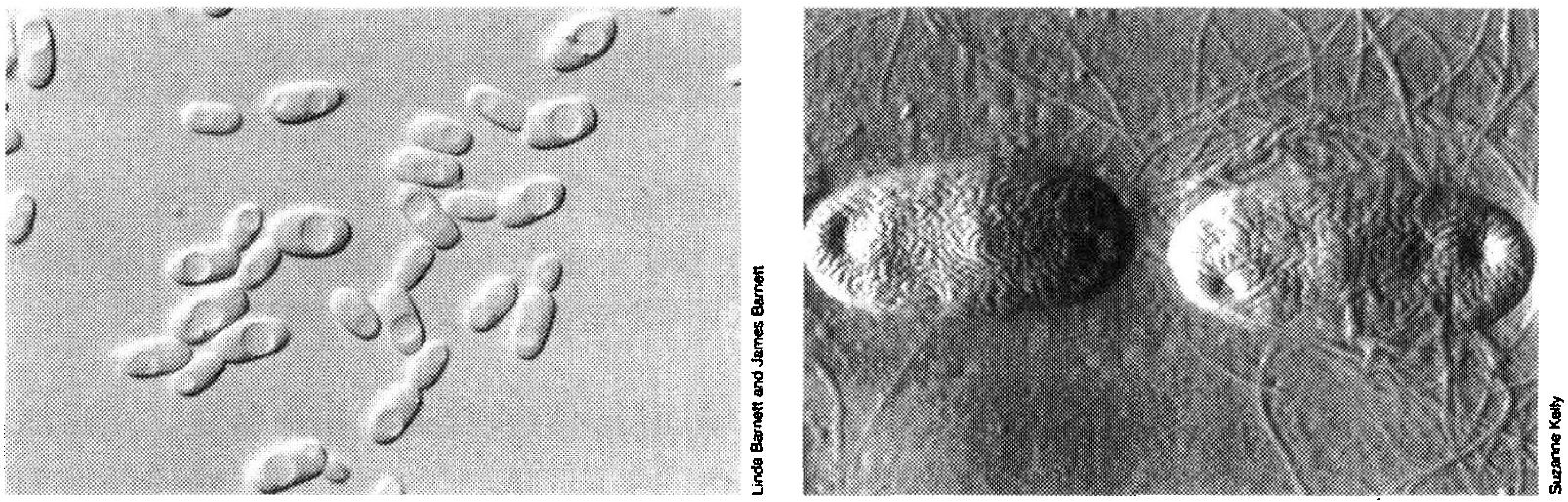
图 4.6　由荧光显微镜检术观察不同微生物的显微照片。（a，b）蓝细菌；（a）明视野显微镜检术观察的细胞。（b）546nm 光照射后的荧光显微镜检术所见的同样细胞，红色是由于叶绿素的自身荧光和其他色素所致。（c）用荧光染料吖啶橙染色的丝状细菌毛霉亮发菌（*Leucothrix mucor*），细胞直径为 3μm，长度可达 100μm。

4.2　三维成像：相差、原子力和激光扫描共焦显微镜检术

光学显微镜检术中所获得的影像是二维的，如何克服这种局限性呢？下一部分我们将介绍的扫描电子显微镜提供了解决这个问题的办法，但它们仍然是光学显微镜检术。

微分干涉相差显微镜检术

微分干涉相差（differential interference contrast，DIC）是一种光学显微镜检术，它利用一个偏振镜产生偏振光。然后偏振光穿过棱镜形成两束独特的光，这两束光经过样本，进入物镜后，两束光再汇合成一束。因为这两束光穿过不同的物质形成稍微不同的折射率，汇合光不能完全同相，而是产生了干涉效应，这种效应增强了细胞结构上的



(a)　　　　(b)

图 4.7　细胞的三维成像。微分干涉相差显微镜检术（a）和原子力显微镜检术（b）。（a）图中酵母细胞的直径约为 8μm，注意这里的细胞核清晰可见（比较图 4.7a 和图 4.5a）。（b）图中细菌细胞的长度约为 2.2μm，该显微照片摄的是插入狗的水盆 24h 后的玻片表面所形成的天然生物膜，原子力显微镜观察前，玻片先风干。

微小差异。因此，通过 DIC 显微镜检术，真核细胞的细胞核（图 4.7a），原核细胞的芽孢、液泡和颗粒体等结构都可获得一个三维影像。DIC 显微镜检术对观察未染色的细胞也特别有用，因为它可显示细胞的内部结构，而明视野技术显示得略差（或甚至看不到）（比较图 4.5a 和图 4.7a）。

原子力显微镜检术

用于生物结构三维成像的另一种类型的显微镜是原子力显微镜（atomic force microscope，AFM）。在原子力显微镜检术中，一个细小的探针位于样本非常近的位置，这样在探针和样本之间形成了弱的推斥原子力。当从水平和垂直方向扫描样本时，探针也随着波峰和波谷上下移动，不停地记录与样本表面的相互作用。这种模式经由一系列检测器处理后，将数字信息传到计算机中，产生了一个影像（图 4.7b）。

尽管从原子力显微镜中获得的影像表面上与从扫描电子显微镜获得的影像类似（比较图 4.7b 和图 4.10b），但 AFM 有一个优点——不需固定剂或包被。因此，利用 AFM 可以观察到活的、水合样本，而用电子显微镜通常是观察不到的。

激光扫描共焦显微镜检术

激光扫描共焦显微镜检术（confocal scanning laser microscopy，CSLM）是一种计算机化显微镜，激光光源配置到光学显微镜上。这种技术可使微生物和其他生物样本形成三维数字影像（图 4.8）。



图 4.8 激光扫描共焦显微镜检术。（a）实验室培养的混合微生物生物膜群落的聚焦图像。绿色的杆状细胞是铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）被实验性地引入到生物膜上。其他不同颜色的细胞存在于生物膜的不同深度。（b）生长在碱湖中的丝状蓝细菌的聚焦显微照片。

在激光扫描共焦显微镜检术中，激光束被镜面反射后直接通过扫描装置，然后激光束穿过一个针孔，它可以精确地调节激光束聚焦的平面到样本的垂直层。精确的照明仅在样本单一的平面，高于和低于聚焦平面时，照明强度都会迅速下降，这样，来自于聚焦其他平面的散射光减到最小。因此，对于一个相对厚度的样本（如微生物生物膜）（图 4.8a），CSLM 不仅可以观察到用传统光学显微镜检术看到的生物膜表面的细胞，而且通过调节激光束聚焦的平面，也可以观察到不同层面上的细胞。

CSLM 细胞制备通常是用荧光染料对细胞进行染色，使其更清楚（图 4.8a）。另

外，通过调节显微镜可以产生错误的颜色图像，这样可以使不同层显示不同的颜色。激光扫描共焦显微镜配有计算机软件，可对数字图像进行后续的图像处理，因此，从不同层面获得的图像可以储存起来，然后数字化地覆盖，重新构建完整样本的三维影像（图 4.8a）。

CSLM 广泛用于微生物生态学，特别是用于鉴定存在于微生物生境中系统发育明显的细胞种群（见实例，图 18.11b），或分离生物膜不同层面的组分（图 4.8a 和图 19.4b）。而且，CSLM 还适用于那些需要检测的厚样本，观察不同深度微生物含量如何。

概念检查

干涉相差（DIC）和扫描共焦（CSLM）是光学显微镜检术，比其他形式的光学显微镜检术形成更大的三维影像，共焦显微镜检术可穿过厚的样本成像。原子力显微镜可产生活样本的细微三维影像。

- 利用微分干涉相差（DIC）显微镜检术比明视野显微镜检术更容易观察到真核细胞的什么结构？（提示：比较图 4.5a 和图 4.7a）
- 为什么激光扫描共焦显微镜检术（CSLM）能够观察到厚样本的不同层面？

4.3 电子显微镜检术

电子显微镜（electron microscope）利用电子代替了光子，使细胞或细胞结构成像。在透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）中，电磁体作为透镜，整个系统在真空中操作（图 4.9）。电子显微镜配有照相机用来拍照，获得的照片称为

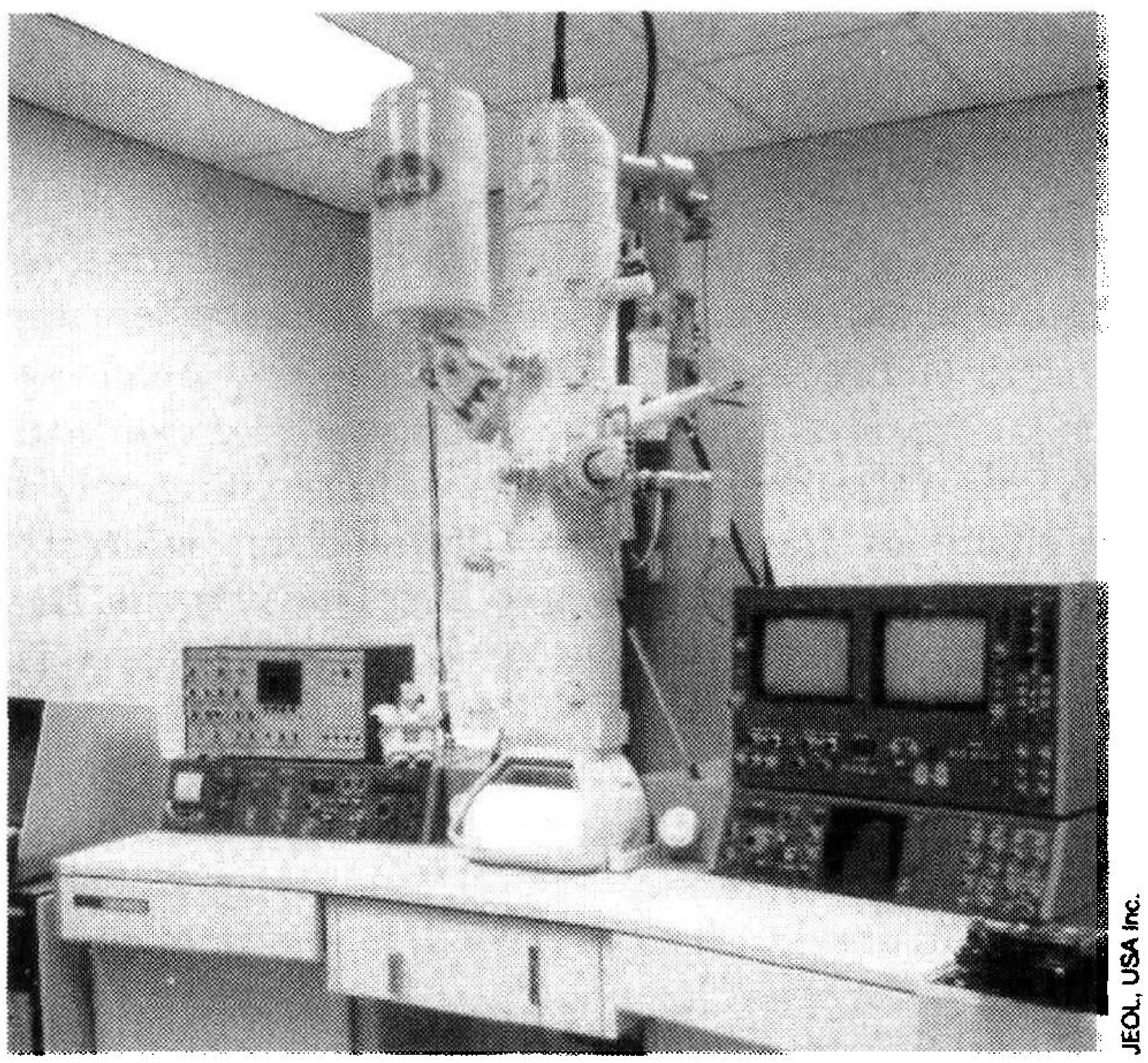


图 4.9　电子显微镜。该仪器具有透射和扫描电子显微镜的两种功能。

电子显微照片（electron micrograph）。

透射电子显微镜主要用于观察细胞的内部结构。电子显微镜的分辨率远远超过光学显微镜，能使人们在分子水平观察结构（图 2.4b）。例如，一台好的光学显微镜的分辨率为 0.2μm，而一台好的透射电子显微镜的分辨率为 0.2nm，因此，像蛋白质和核酸这样的单个分子可以在电子显微镜下观察到。

与可见光相比，电子束不能很好地穿过样品，以至于一个单个细胞也因太厚而不能直接观察，这时就需要薄切片技术来准备电子显微镜样品。例如，单个的细菌细胞可切成许多的薄片（20～60nm），然后用电子显微镜对其逐一观察（图 4.10a）。为得到足够的反差，制片需用染料（如锇酸、高锰酸钾、铀、镧或铅盐）处理。由于这些物质都是由相对分子质量高的原子组成，它们能有效地散射电子，从而提高反差效果（图 4.10a）。

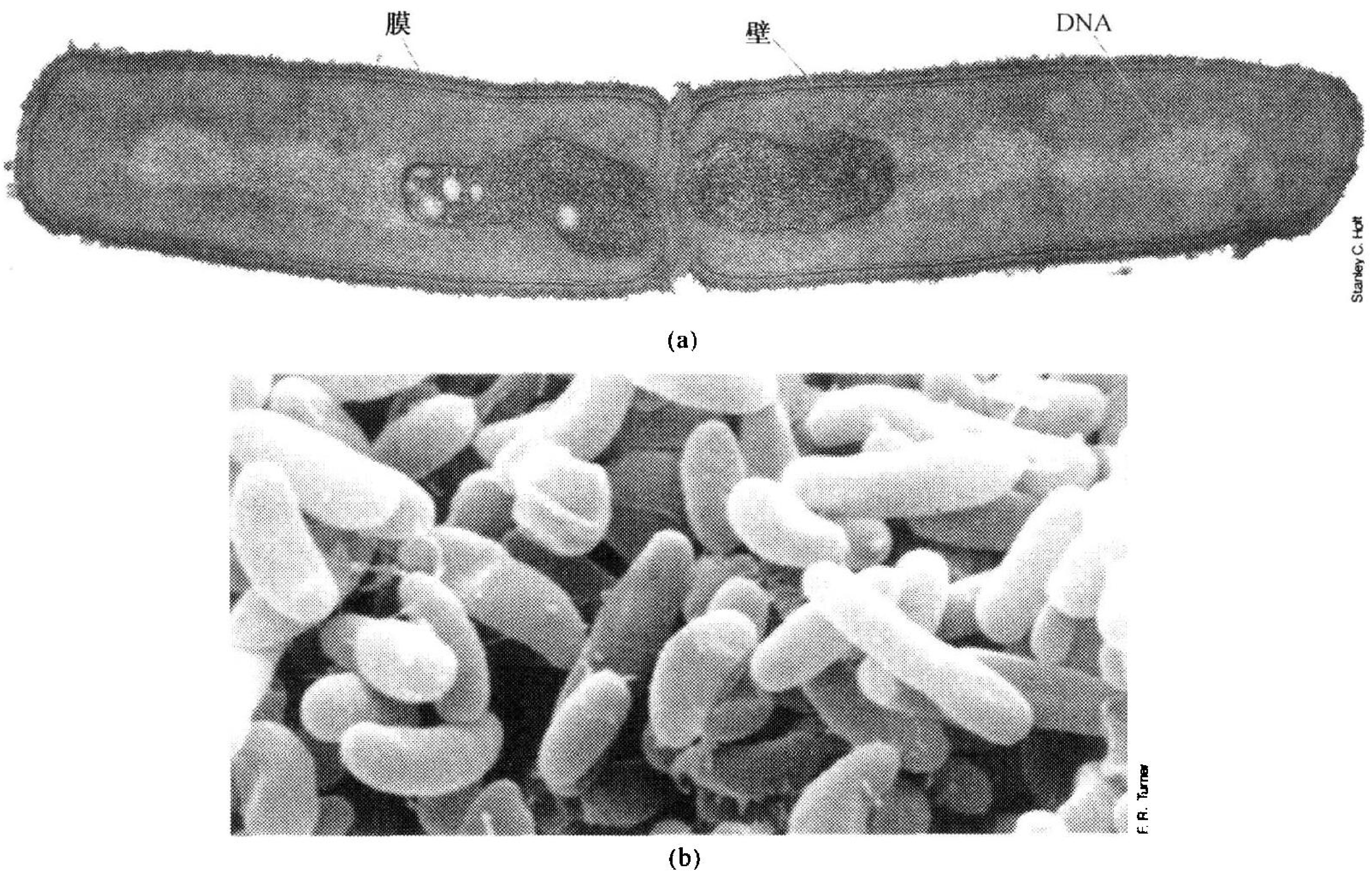


图 4.10　细菌细胞的电子显微照片。透射电子显微照片（a）和扫描电子显微照片（b）。（a）一个典型的革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的超薄切片，细胞刚刚分裂，两个含膜的结构附着于横壁上。注意中间亮的区域（DNA 或拟核），细胞直径约为 0.8μm。（b）光养细菌 *Rhodovibrio sodomensis* 的细胞，单个细胞约为 0.75μm 宽。注意扫描电子显微照片景深是多么大，因此获得了非常好的三维影像。

扫描电子显微镜检术

如果只观察生物体的外部特征，就不必做超薄切片，可以利用一种称为负染色法（negative staining）的技术，通过 TEM 直接观察完整细胞或细胞组成（图 4.54）。另一种方法是用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）（图 4.9 和图 4.10b）。

在扫描电子显微镜检术中，待检样品需用一种重金属（如金）镀一层薄膜，从 SEM 中发出的电子束直接照射在样品上，并围绕其来回扫描，被金属散射的电子集中起来，激发观察屏，使之产生影像（图 4.10b）。利用 SEM，即使是相当大的样品也可以观察，其景深是很好的。SEM 的放大范围很广，从 15×到大约 100 000×，但只能看清楚物体的表面。

概念检查

电子显微镜比光学显微镜有更高的分辨率，最高分辨限度为 0.2nm，目前所用的两种主要的电子显微镜检术类型是：用于观察内部细胞结构至分子水平的透射电子显微镜检术和用于三维成像及观察表面结构的扫描电子显微镜检术。

◆ 什么是电子显微照片？根据所获得的成像，电子显微照片与显微照片有何不同？

◆ 记住化学固定是必需的，并且电子显微镜必须在真空下操作，电子显微镜与光学显微镜相比有什么主要的缺点？

◆ 你将使用哪种类型的电子显微镜观察细菌的拟核？

4.4 细胞形态学和形体微小的重要性

在生物学中，形态学（morphology）一词是指细胞形状。在原核生物中已知有几种形态，而且大部分可以识别，并用专业术语来描述它们。这里我们先讨论形态学，然后看一看微小细胞的一些生物优势。

主要的细胞形态学

在图 4.11 中显示了典型细菌的形状，均为相差显微照片。在形态学上球形或卵形的细菌叫做球菌（coccus），圆柱形的细菌叫做杆菌（rod），一些杆菌弯曲，通常变为螺旋形，这样的菌叫做螺菌（spirillum）。在许多原核生物中，细胞分裂后仍然以组或群的形式聚集在一起，而且这种排列通常是不同生物的特征。例如，球菌和杆菌可以形成链状，一些球菌形成薄薄的细胞片，而另一些球菌可以组成三维的立方体形式或类似于立方体的细胞群。

某些类型的细菌可以从它们独特的形状中立刻被辨认出来。例如，螺旋体（spirochete），它们是紧紧缠绕的细菌；附加体细菌（appendaged bacterium），细胞伸长部分成长管或柄状；还有丝状细菌（filamentous bacterium），形成长而细的细胞或细胞链（图 4.11）。图 4.11 中的细胞形状是研究较清楚的并具代表性的形态，在已知的微生物世界中已经发现了这些基本形态学类型的其他变化形式，包括细微的和明显的变化。

微生物细胞的大小及其重要性

原核细胞间的大小变化很大，从直径小于 0.2μm，到直径大于 50μm。一些很大的原核生物［如棕色刺尾鱼（surgeonfish）］的共生生物费氏刺骨鱼菌（*Epulopiscium fishelsoni*）（图 4.12a），直径可达 80μm，长为 0.6mm（表 4.1）。根据总的细胞体积，

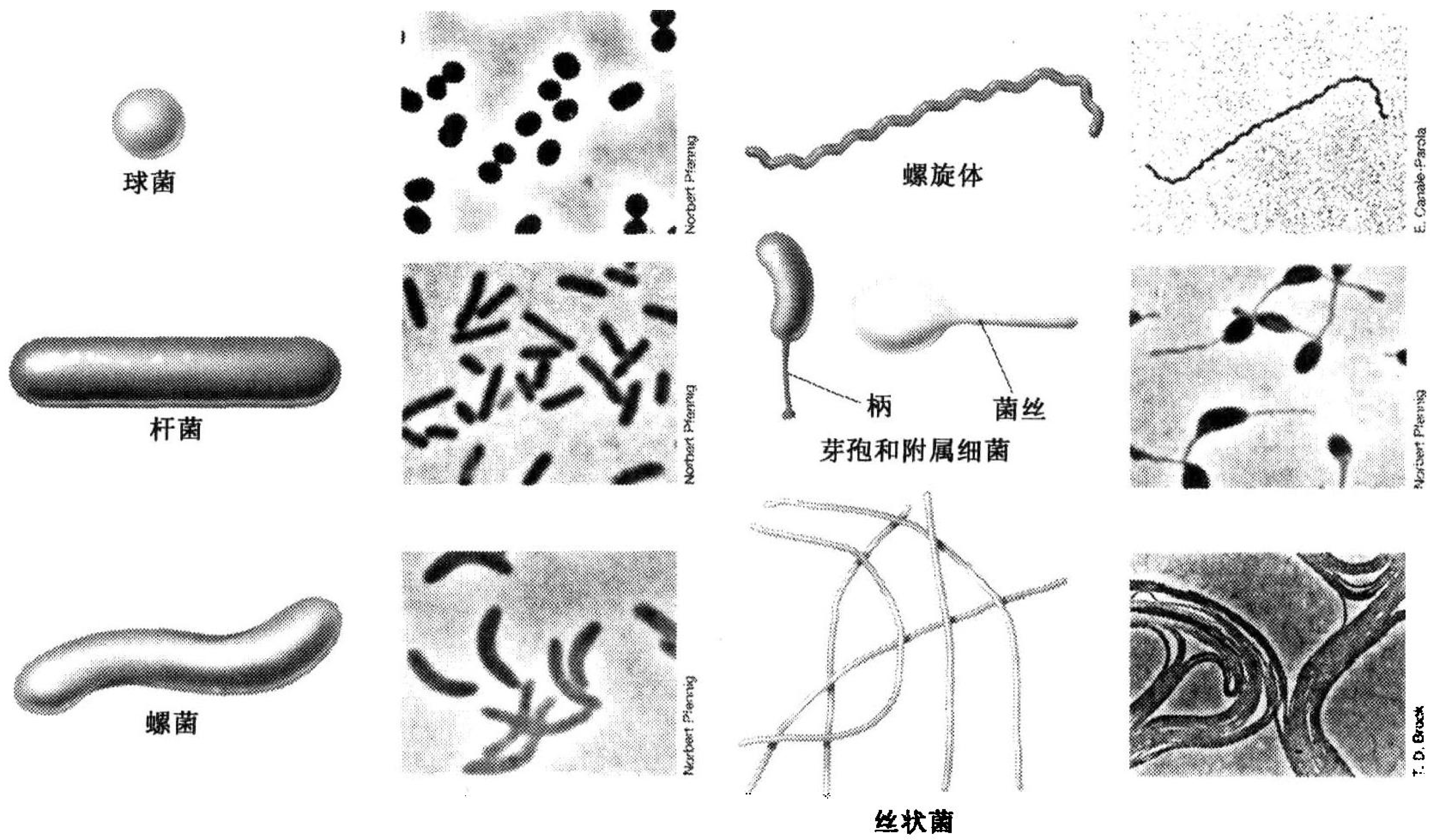


图 4.11 原核生物具有代表性的细胞形状（形态学）。 每一幅图画的旁边是一相差显微照片显示每种形态的例子。球菌是桃红荚硫菌（*Thiocapsa roseopersicina*）（细胞直径为 1.5μm）；杆菌是乙酸氧化脱硫单胞菌（*Desulfuromonas acetoxidans*）（直径为 1μm）；螺菌是深红红螺菌（*Rhodospirillum rubrum*）（直径为 1μm）；螺旋体是紧卷螺旋体（*Spirochaeta stenostrepta*）（直径为 0.25μm）；芽孢和附加体是万尼氏红微菌（*Rhodomicrobium vannielii*）（直径为 1.2μm）；丝状菌是橙色绿屈挠菌（*Chloroflexus aurantiacus*）（直径为 0.8μm）。

已知最大的原核生物是硫化能无机自养菌硫珍珠状菌属（*Thiomargarita*）（图 4.12b），直径达 0.75mm，几乎可用肉眼观察到。

表 4.1 从最大的到最小的原核细胞的大小和体积

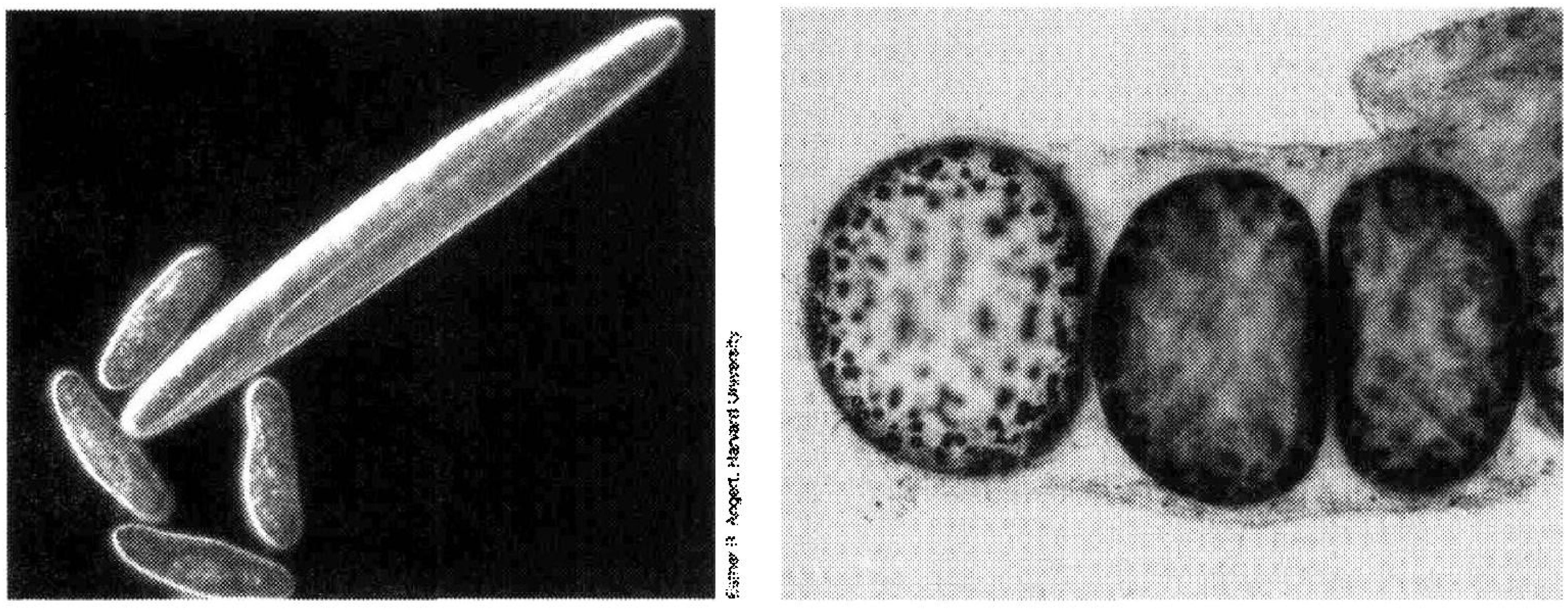
生物	特征	大小[a]/μm	细胞体积/μm³
纳米比亚硫珍珠状菌（*Thiomargarita namibiensis*）	球形的硫化能无机自养菌	750	200 000 000
费氏刺骨鱼菌（*Epulopiscium fishelsoni*）	化能有机异养菌	80×600	3 000 000
贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa* sp.）	丝状的硫化能自养菌	50×160	1 000 000
草酸无色菌（*Achromatium oxaliferum*）	椭球状硫细菌	35×95	80 000
巨大鞘丝蓝细菌（*Lyngbya majuscula*）	丝状的蓝细菌	8×80	40 000
原绿蓝细菌属（*Prochloron* sp.）	原绿藻菌	30	14 000
大卵硫菌（*Thiovulum majus*）	球形的硫化能无机自养菌	18	3 000
海葡萄嗜热菌（*Staphylothermus marinus*）	超嗜热菌	15	1 800

续表

生物	特征	大小[a]/μm	细胞体积/μm^3
Titanospirillum velox	杆状的硫化能无机自养菌	5×30	600
Magnetobacterium bavaricum	趋磁细菌	2×10	30
大肠杆菌（*Escherichia coli*）	化能有机异养菌	1×2	2
肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*）	病原细菌	0.2	0.005

a. 表中只给一个数据的是球形细胞的直径，所给的值是每个种所观察到的最大细胞的大小，如纳米比亚硫珍珠状菌细胞的平均直径约 200μm，但偶尔，可以观察到直径为 750μm 的巨大细胞。同样，海葡萄嗜热菌细胞的平均直径约 1μm。

引自：Schulz H N，Jorgensen B B. 2001. *Ann. Rev. Microbiol.* 55：105～137。



(a)　　(b)

图 4.12　一些巨大的原核生物。(a) 一种大型的原核生物棕色刺尾鱼（surgeonfish）的共生生物费氏刺骨鱼菌（*Epulopiscium fishelsoni*）的暗视野显微照片。该视野中杆状的费氏刺骨鱼菌细胞约 600μm 长，75μm 宽，同时显示了 4 个原生生物（真核生物）草履虫（*Paramecium*），每个约 150μm 长，费氏刺骨鱼菌属于细菌中的一员，并且与梭菌属（*Clostridium*）在系统发育上有关。(b) 纳米比亚硫珍珠状菌（*Thiomargarita namibiensis*），一种大的硫化能无机自养菌，是目前已知最大的原核生物，单个球形细胞约 400μm 宽。也可以见表 4.1 一些大的和小的原核生物。

原核细胞在大小和体积上变化非常大（表 4.1），多数巨大的原核生物是硫化能无机自养菌或蓝细菌（见第 2 章和表 4.1）。尽管硫细菌个体较大，其可能的机制是为了储存较高水平的底物，但这些细胞为什么如此之大，还不是很清楚。据认为扩散和代谢的限制决定了原核生物细胞大小的上限。细胞代谢率的变化随细胞大小的平方呈反比。因此，对于巨大的细胞，扩散过程可能最终限制代谢，导致细胞缺乏长期的竞争性。

巨大的细胞在原核生物世界并不常见。与硫珍珠状菌属或 *Epulopiscium* 相比（图 4.12），杆状原核生物的平均大小，如大肠杆菌（*Escherichia coli*）约为 1μm×3μm，代表了大多数原核生物细胞的大小。相比之下，真核细胞直径可以从 2μm 到 200μm 以上。总的来说，原核生物与真核生物相比就显得非常小了。

多数原核生物非常小的可能原因是由于这种小的特点使其具有重要的优势。例如，养分和废物进出小的细胞比大的细胞更容易，这样就加速了细胞代谢和生长。因为相对

于细胞体积来说，小的细胞比大的细胞有更多可利用的表面，这一点可以很容易地用一个球的例子来说明。体积是半径立方的函数（$V=4/3\pi r^3$），而表面积是半径平方的函数（$S=4\pi r^2$）。表面积与体积的比率（S/V）可以表示成 $3/r$（图 4.13）。细胞的半径越小，那么表面积与体积的比率就越大于半径大的细胞。

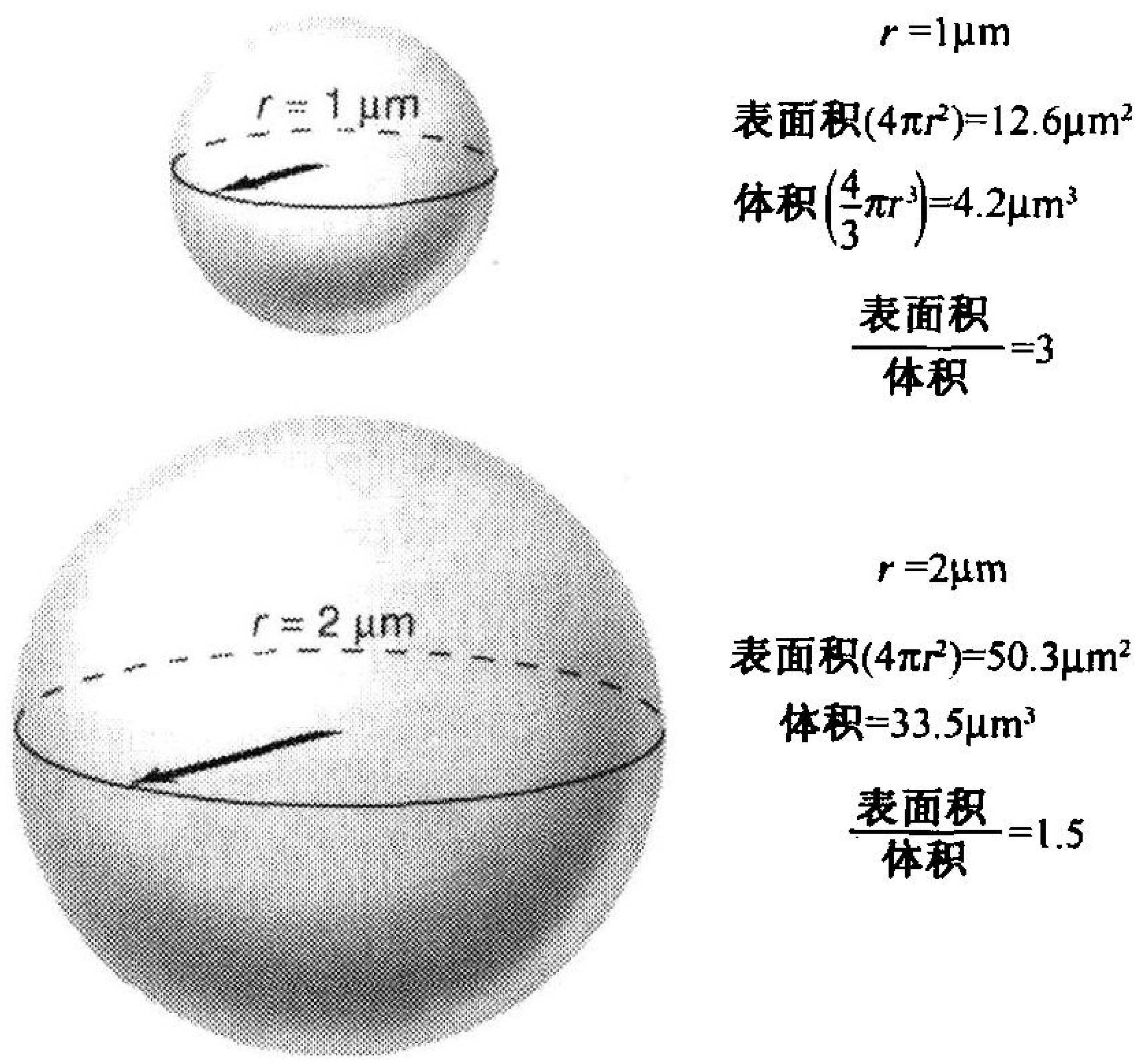


图 4.13 细胞中表面积与体积的关系。当一个细胞大小增加时，其表面积与体积比降低。

除了养分的交换外，S/V 的比率还影响细胞生物学的其他方面。例如，因为生长速率在一定程度上依赖于养分交换的速率，所以小的细胞所具有的较高 S/V 要比大的细胞能更好地支持其更快速地生长。而且，从每单位可获得的资源来讲，小的细胞比大的细胞能快速地发育成更大的群落。对于所有生物，因为突变率是相同的，那么较大的细胞群落意味着更多的细胞分裂，这也预示来自于 DNA 复制过程中自然的错配所带来更多的突变积累，而突变是促使进化改变的源泉，加之原核生物是遗传单倍体（见 2.2 节），使得有益的突变会立即表达，原核生物体积微小最终可以解释为什么这些生物可快速适应改变的环境条件并且很容易地利用栖息地。

细胞大小的最低限度

在此之前，似乎是越小的细菌在自然界中将有越大的选择优势。显然，对于细胞大小有一个最低限度，但这个限度究竟是多大呢？一些微生物学家提出自然界存在非常小的细菌，称为微小细菌（nanobacteria）。推算球形结构的微小细菌直径约为 0.1μm，甚至更小。按照原核生物的标准（表 4.1），这已经是非常小了，微小细菌是真的细胞吗？

多数微小细菌的报道是关于它们在环境中的沉淀物和生物膜的假定形成的（见 19.3 节），如同矿物质的表面和人类的组织一样多样。尽管一些微生物学家坚定地相信微小细菌的概念，但是另一些微生物学家声称微小细菌仅仅是非生命物质的化学或地球化学反应的假象，甚至说最小的已知细菌细胞也比报道的微小细菌明显得大（表 4.1），并且，如果人们认为需要空间储存所有生命必需的生物大分子，那么这些物质存在于 0.1μm 或更

小体积的这种结构中是极不可能的。因此，微小细菌是否是有生命的生物仍是一个悬而未解的问题。如果这种微小细胞确实存在的话，那它们将是最小的已知生命结构。

无论微小细菌的地位如何，许多微生物栖息地明显地具有非常小的细胞。例如，在开阔的海洋，每升海水含有 10^4～10^5个原核细胞，多数是直径为 0.2～0.4μm 的微小细胞。我们将看到许多病原细菌也非常小。因此，可以断定微小细胞确实存在于自然界中，但是小于 0.2μm 的结构可能不是具有活力（具有繁殖能力）的细胞。

概念检查

原核生物在大小上比真核生物明显得小，而且原核细胞具有多种多样的细胞学形态。原核细胞个体微小的特性影响着它们的生理学、生长速率和生态学。小于 0.2μm 类似细胞的结构可能是，也可能不是活的生物。

◆ 列出原核生物的三种形态类型。

◆ 当细胞变小时，细胞的哪些物理特性增加了？

Ⅱ 细胞膜和细胞壁

现在我们来讨论原核生物两种非常重要的细胞结构：细胞质膜和细胞壁。每一种都将进行完整的定义，并讲述其对细胞的重要功能，包括养分的运输（膜）和渗透裂解的预防（壁）。

4.5 细胞质膜：结构

细胞质膜（cytoplasmic membrane）是完全包围着细胞的一个很薄的结构，只有 8nm 厚，这个必不可少的结构是把细胞内部（细胞质）同它的环境分隔开的关键屏障。如果膜破裂，细胞的完整性将受到破坏，细胞质渗透到环境中，从而使细胞死亡。细胞质膜也是一个具有高度选择透性的屏障，它能使细胞浓缩特殊的代谢物，并排泄废物。

膜的化学组成

大多数生物膜的一般结构是磷脂双分子层（phospholipid bilayer）（图 4.14），正如在 3.4 节中所讲的那样，磷脂含有疏水区域（脂肪酸）和亲水区域（磷酸甘油）两部分，能以不同的化学形式存在，这种不同形式是甘油骨架中基团变化的结果。当磷脂在水溶液中聚集时，它们自然地形成双分子层结构，脂肪酸互相朝向里面形成一个疏水环境，亲水部分暴露在外部的水环境中（图 4.14），膜的双分子层特性是脂分子在水环境中最稳定的排列方式。

细胞质膜的薄切片可用电子显微镜观察（图 4.15a），细胞质膜呈现出被一个深色区域隔开的两条较光亮的线（图 4.15a）。这通常被称为单位膜（unit membrane）（因为每个磷脂分子形成半个“单位”），由磷脂（图 3.7）双分子层组成，蛋白质嵌入其中（图 4.16）。细胞质膜的主要蛋白质具有典型的高度疏水的外表面，其中的蛋白质是跨

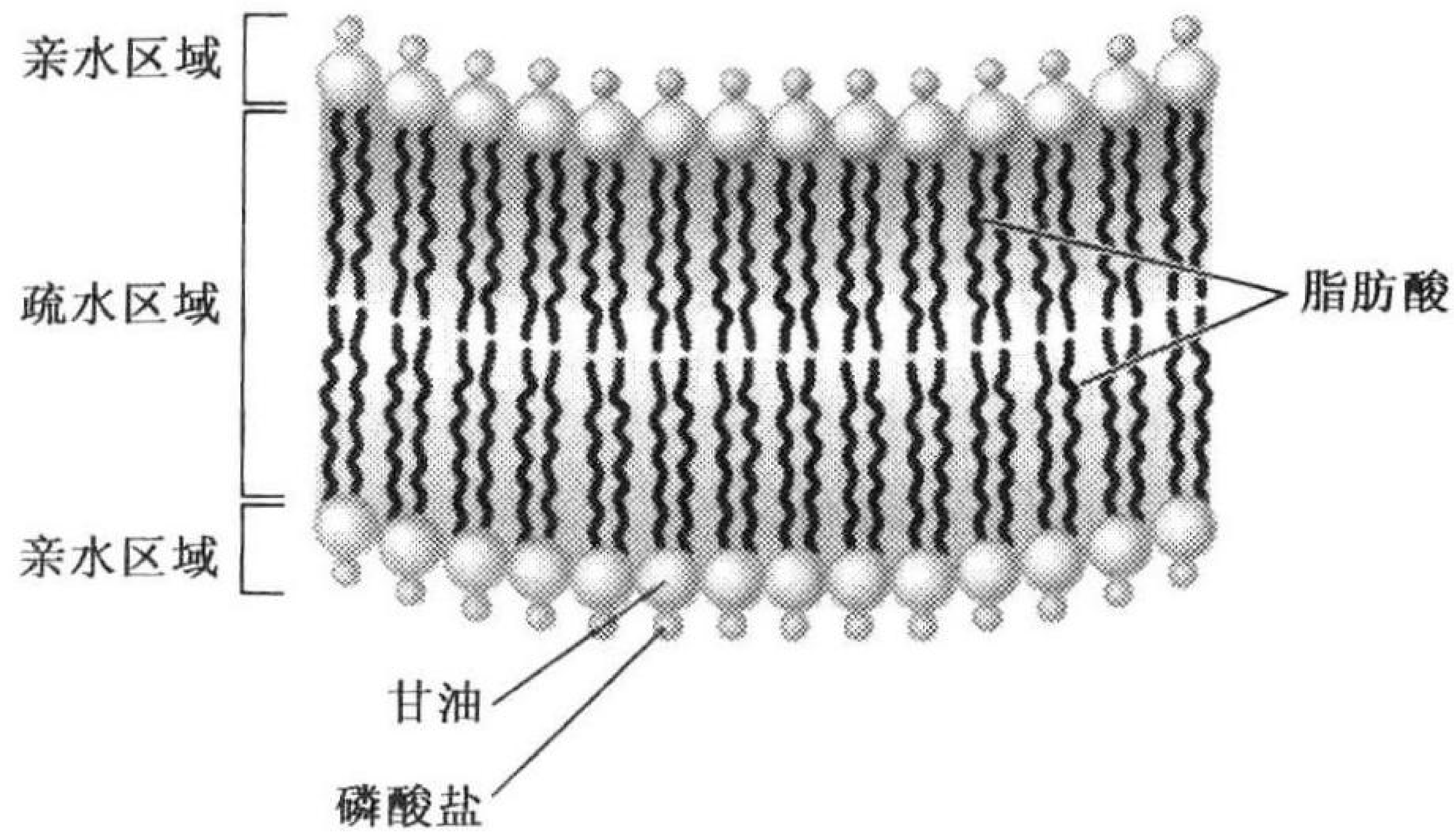


图 4.14 磷脂双分子层的结构。细胞质膜约 8nm（80Å）宽。见图 3.7 磷脂的结构。

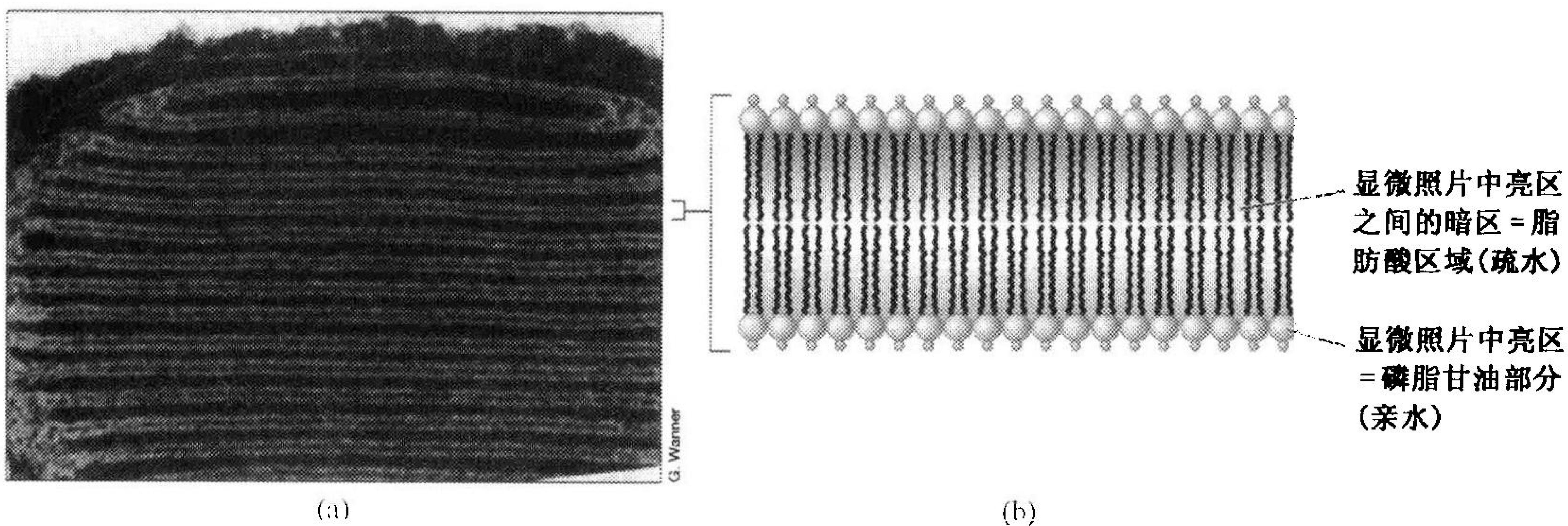


图 4.15 细胞质膜。(a) 光养细菌盐绿需盐红螺菌（*Halorhodospira halochloris*）原生质膜衍生的光合作用用膜堆的电镜照片，注意多层的脂双分子层，每个双层分子约 8nm 厚。(b) 显示 a 图中的单个单位膜的放大示意图。

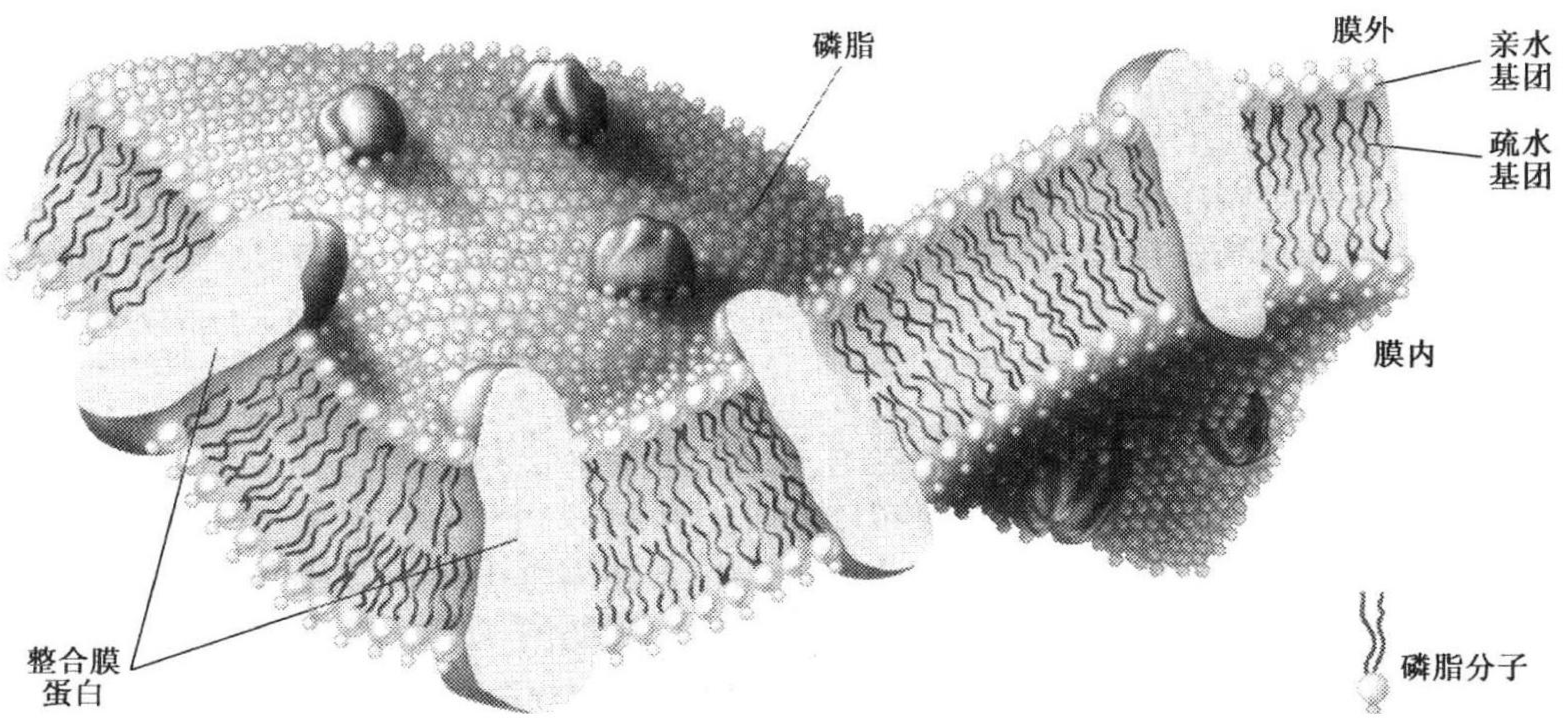


图 4.16 细胞质膜的结构。内表面面向细胞质，外表面面向环境。细胞质膜基质是由磷脂组成的，疏水基向内，亲水基向外与水相连。埋入基质的是蛋白质，横跨脂肪酸双分子层的区域具有疏水特性，亲水蛋白质和其他带电荷的物质（如金属离子）可附着在亲水基团表面，尽管在原核生物和真核生物中有一些化学组分不同，但它们的细胞质膜的结构基本是相似的（但图 4.19d 双分子层图示除外）。

膜的，而亲水的表面与环境和细胞质膜相连（图 4.16）。细胞质膜整个结构的稳定性主要依靠氢键和疏水作用，此外，阳离子（如 Mg^{2+}、Ca^{2+}）也与磷脂的负电荷结合，从而有助于膜结构的稳定。

膜蛋白

细胞质膜的外表面接触环境，所以细菌肯定具有用来结合底物或携带大分子并将其运进细胞的蛋白质（周质蛋白，见 4.7 节和 4.9 节的讨论）。细胞质膜的内层对着细胞质，与进行产能反应和其他重要细胞功能的蛋白质相互作用。

许多膜蛋白牢固地包埋在膜上，被称为整合膜蛋白（integral membrane protein）。其他的一些蛋白质尽管没有包埋在膜上，但可与膜表面紧密结合，并像膜结合蛋白一样行使功能，包括周质内的蛋白质（革兰氏阴性菌细胞质膜与外膜之间的区域，见 4.9 节）和一些细胞质蛋白。一些所谓的外周膜蛋白（peripheral membrane protein）是一类脂蛋白，在蛋白质的氨基末端有一个脂质尾巴，其作用是将蛋白质固定在膜上，这些蛋白质直接与参与重要的细胞过程（如能量代谢）的整合膜蛋白相互作用。

图解中，细胞质膜可能显示得有些僵硬，但实际上（图 4.15 和图 4.16）细胞质膜是流动的，磷脂和蛋白质分子在膜表面的移动有很大的自由性，膜具有近似于轻度油那样的黏性。因此，整合膜蛋白可跨越一个高度流动的、高度有序的磷脂双分子层。我们将在下一节讨论这种膜流动镶嵌结构是如何赋予膜功能的。

膜增强剂：固醇和类何帕烷

真核细胞与原核细胞的膜在化学组分上一个重要不同点是真核生物的膜具有固醇（sterol）（图 4.17a，b），所有的原核生物都缺乏固醇（甲烷营养细菌和支原体除外，见 12.6 和 12.21 节）。根据细胞的类型，固醇可占真核细胞膜所有脂质的 5%～25%。

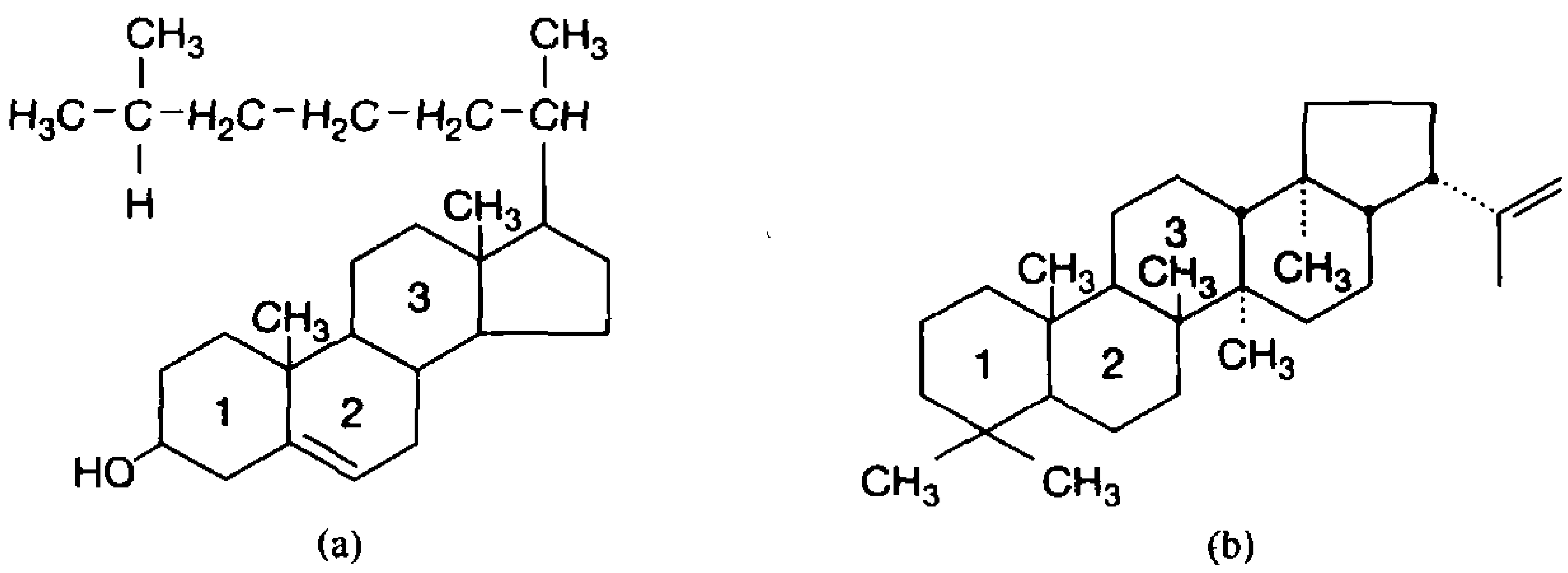


图 4.17 固醇和类何帕烷。（a）胆固醇结构，一种典型的固醇。（b）类何帕烷的结构。在真核生物的膜中发现了固醇，在一些原核生物的膜中发现了类何帕烷。环内标记（1、2 和 3）是指与固醇和类何帕烷母核高度相似的结构。

固醇及相关的分子是一类坚硬的平面分子，而脂肪酸是柔韧的，因此存在于膜中的固醇可稳定膜结构，使柔韧性减少。与固醇类似的分子称为类何帕烷（hopanoid），存在于许多细菌的膜中，起着类似于固醇在真核生物中的作用。一种广泛分布的类何帕烷是 C_{30}类何帕烷 diploptene（图 4.17b）。据目前所知，有些种的古生菌不存在类何帕烷。

古生菌的膜

古生菌的脂质不同于其他生物的脂质，细菌和真核生物的脂质是由酯键（ester linkage）连接脂肪酸和甘油分子（图 4.18a；见 3.4 节），而古生菌的脂质在甘油和其疏水侧链间是醚键（ether linkage）。另外，古生菌脂质缺乏脂肪酸，取而代之的是由五碳的碳氢化合物异戊二烯（isoprene）的重复单位组成的侧链（图 4.18c）。不过，古生菌的细胞质膜总的结构仍然与细菌和真核生物一样，即内、外亲水的表面和疏水的内部。

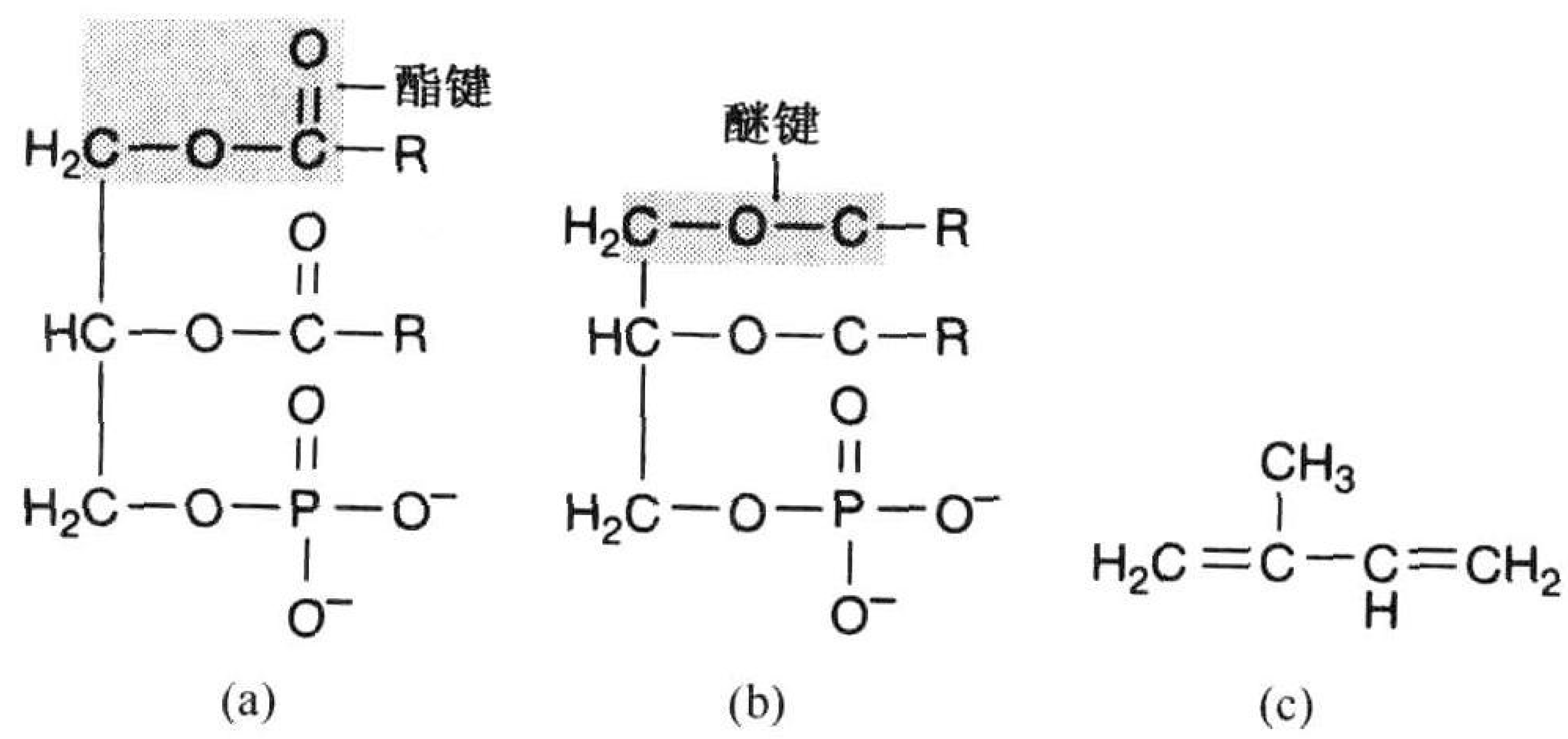


图 4.18　类脂中的化学键。（a）细菌和真核生物类脂中发现的酯键。（b）古生菌类脂中的醚键。（c）异戊二烯，古生菌类脂疏水侧链的母核结构。与细菌和真核生物类脂相比，其侧链是由脂肪酸组成的。

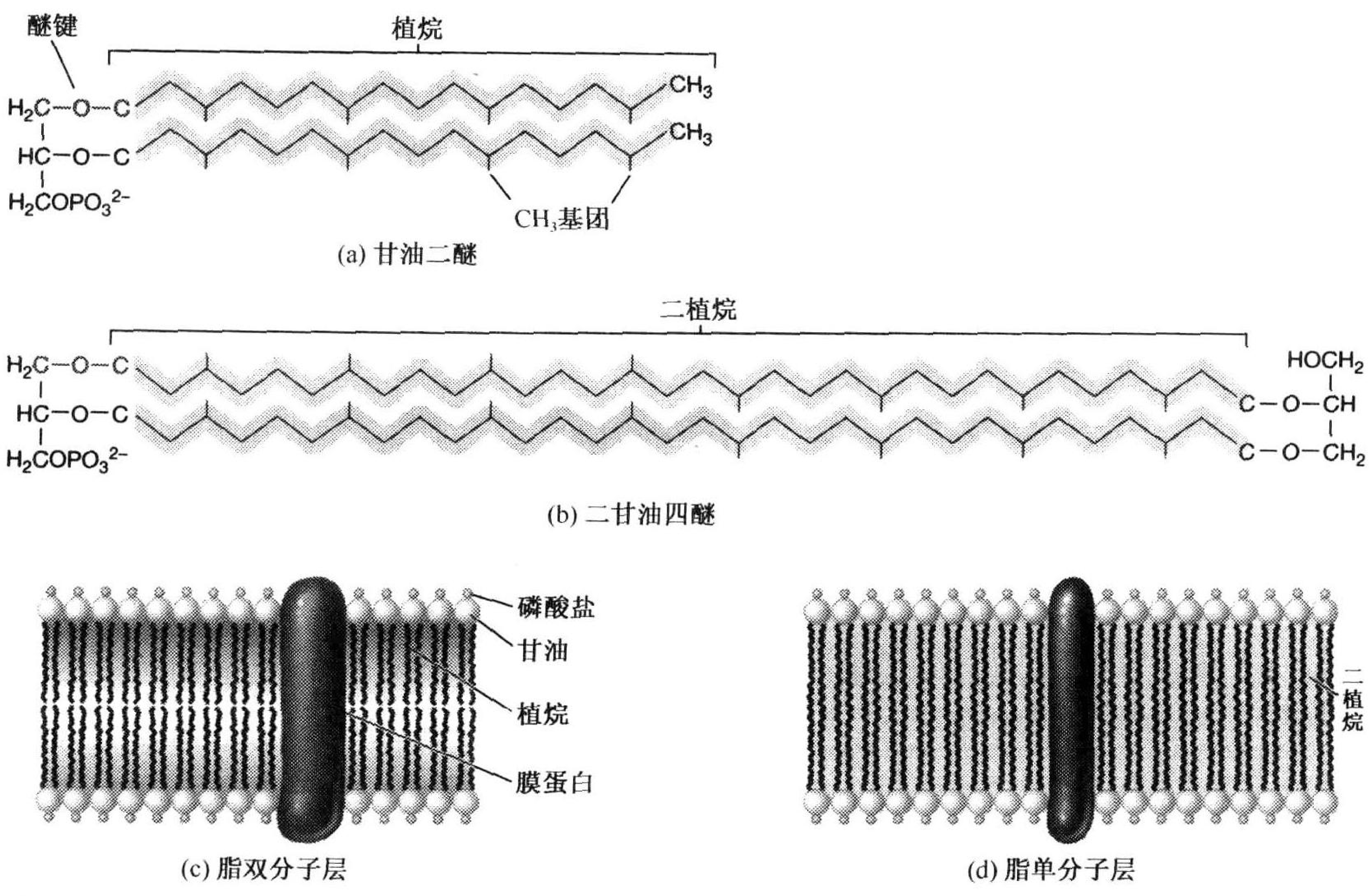


图 4.19　古生菌的主要类脂和古生菌膜结构。（a）甘油二醚。（b）二甘油四醚。注意在这两个例子中，碳氢化合物通过醚键与甘油连接，（a）中的碳氢化合物是植烷（C_{20}），（b）中的是二植烷（C_{40}）。（c，d）古生菌膜结构，（c）脂双分子层。（d）脂单分子层。

甘油二醚（glycerol diether）和二甘油四醚（glycerol tetraether）（图 4.19a，b）是存在于古生菌中的主要脂质类型。四醚分子中每个甘油分子的植烷（由四个相连的异戊二烯组成）侧链是由共价键结合的（图 4.19b），因此，这种结构形成了一个脂单分子层，代替了脂双分子层（图 4.19d）。脂单分子层可抵抗剥离，因此这种膜结构广泛存在于超嗜热古生菌中，这种古生菌是能在非常高温度下生长的原核生物（见 6.10 节和 13.5～13.10 节）。

有许多其他的特性可把原核生物细菌和古生菌分开，但是膜脂质的化学组成是确定每一个系统进化群的主要特征。

概念检查

细胞质膜是一个高度可选择渗透性的屏障，由脂质和蛋白质组成，形成了一个亲水的外部和疏水的内部的双分子层，如固醇和类何帕烷等其他分子可以加固膜，整合蛋白参与运输。与细菌和真核生物不同，古生菌含有醚键的脂质，一些种由单分子层的膜替代了双分子层膜的结构。

◆ 画出脂双分子层的基本结构。

◆ 为什么像固醇和类何帕烷的化合物能较好地稳定细胞质膜?

◆ 比较细菌和古生菌甘油与脂质疏水部分的键。

4.6 细胞质膜：功能

细胞质膜不仅仅是分隔细胞内部与外界的屏障。它还在细胞功能上起着某些重要的作用。第一，也是最重要的，作为渗透性屏障的膜功能，阻止细胞质组分进出细胞的被动渗漏（图 4.20）。另外，膜上存在着许多蛋白质，一些是酶，参与生物能的功能，另一些参与底物进出细胞的运输。

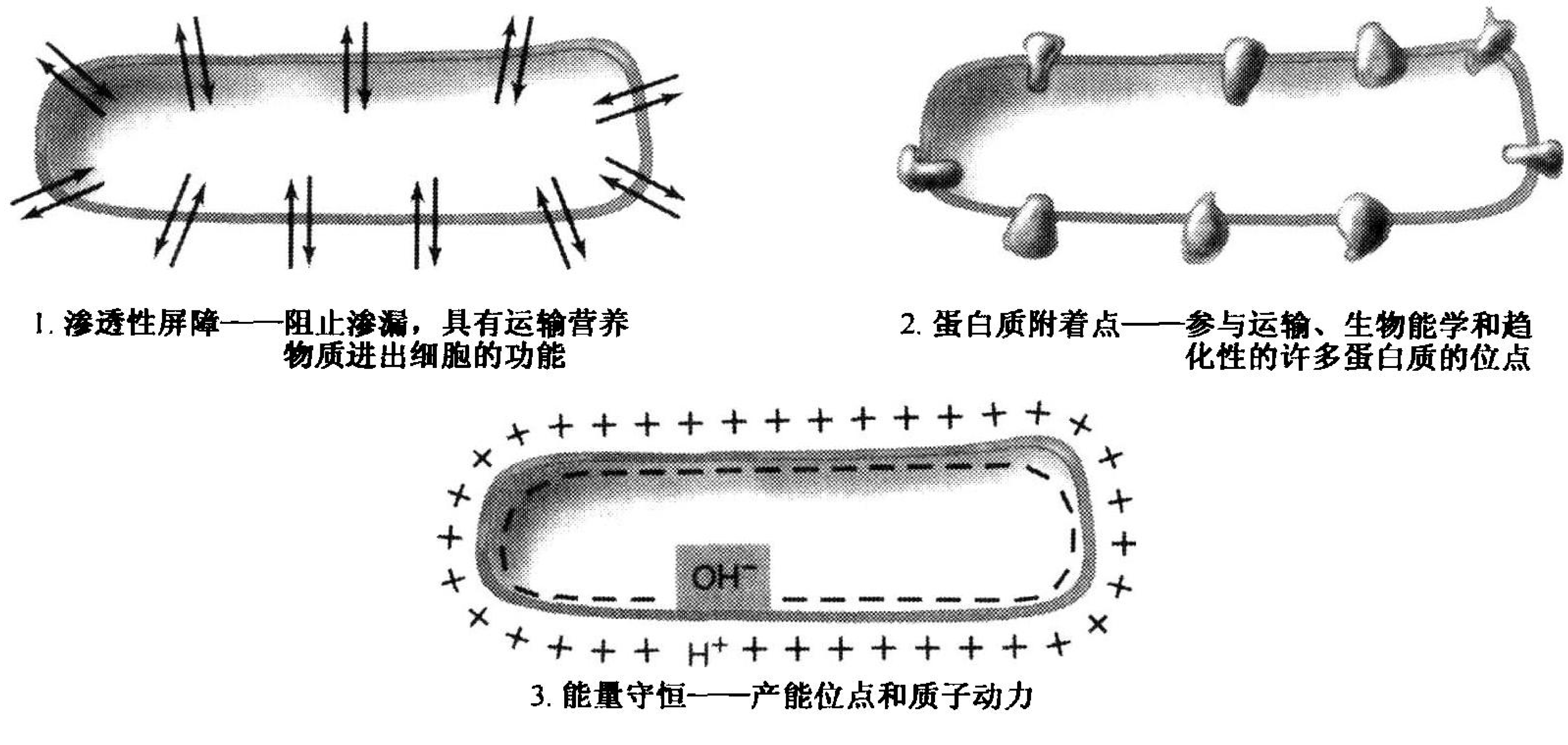


图 4.20　细胞质膜的主要功能。尽管结构上较弱，但细胞质膜具有许多重要的细胞功能。

我们将在第 5 章学习细胞质膜是细胞中能量守恒的主要部位。膜存在着丰富的电荷，在其表面用质子（H^+）和氢氧根离子（OH^-）分开（图 4.20）。电荷分离是能量的一种形式，类似于存在一个负荷电池的潜在能量。膜的这种能量状态称为质子动力（proton motive force，PMF），负责驱动细胞中许多需要能量的功能，包括某些运输方式、运动和细胞能量流通 ATP 的生物合成。

细胞质膜渗透性屏障作用

细胞内部（细胞质）由盐类、糖类、氨基酸、核苷酸、维生素、辅酶及其他各种可溶性物质的水溶液组成。细胞质膜内部（图 4.16）的疏水特性使它形成了一层紧密的扩散屏障。尽管一些小的疏水分子可以通过扩散穿过膜，但是亲水的带电荷分子不能通过，而必须经过特殊的运输过程。因为带电荷，即使是像氢离子（H^+）那么小的物质也不能扩散穿过细胞膜。

有一种分子可以自由进出膜，那就是水，它很小，可在磷脂双分子层间通过（表 4.2）。一种称为水通道蛋白（aquaporin）的运输蛋白可以极大地加速水运输通过膜，这些蛋白质形成跨膜通道，特异性地运输水进出质膜。例如，大肠杆菌（*Escherichia coli*）的水通道蛋白 AqpZ 是一个研究较为透彻的水通道，在低渗透条件下，AqpZ 蛋白的合成大量增加，在该条件下，AqpZ 功能可作为水的输出者，阻止细胞遭受低渗的休克。在高渗条件下，存在较低量的 AqpZ，此时的蛋白质功能是运输水进入细胞，抵抗水分子从胞内向胞外渗出。

表 4.2　不同物质膜渗透性的比较

物质	渗透率[a]
水	100
甘油	0.1
色氨酸	0.001
葡萄糖	0.001
氯离子（Cl^-）	0.000001
钾离子（K^+）	0.0000001
钠离子（Na^+）	0.00000001

a. 相对单位以水的渗透性为基准，表示为 100。膜对水的渗透性受水通道蛋白的影响（见正文）

表 4.2 显示的是一些生物上重要物质的相对渗透性，从表中可以看出，大部分物质不能被动进入细胞，因此运输过程是必需的。表 4.2 数据也表明原核细胞中水的流动借助于水通道蛋白，并不是完全由于扩散通过膜。

转运蛋白的必要性

转运蛋白仅仅是运送物质穿过膜——它们积累溶质形成一个逆浓度梯度。在微生物中，载体介导运输机制的必要性是很容易理解的，如果扩散是溶质进入细胞的唯一方式，那么细胞将不能达到进行生物化学反应所需的细胞内浓度。这是因为吸收速率和细胞内可扩散的溶质水平两者与胞外浓度成比例（图 4.21）。可是，自然界中，营养物的浓度通常是非常低的，明显低于典型的微生物培养基（实验室用于微生物生长的溶液）。因此，细胞必须具有积累营养物高于自然界的机制，这就是运输系统的功能。

不同于简单扩散，载体介导的运输显示出一种饱和效应，如果底物浓度高到足以使载体饱和的程度（这种情况甚至常常地发生在非常低的底物浓度），此时吸收速率达到最大值，即使加入更多的底物也不增加吸收速率（图 4.21）。这种特点极大地帮助细胞从一个非常稀释的营养物环境中浓缩营养物到细胞质中。

载体介导运输过程的另一个特点是运输具有高度特异性。许多载体蛋白只与一种分子反应，而其他蛋白质则显示出与另一类分子具有亲和性。例如，具有运输各种相关糖类和氨基酸的载体，这种经济的运输方式减少了将运输蛋白与每一种氨基酸或糖类分开的需要。

转运蛋白的合成也受细胞的调节，以致存在于膜上的转运蛋白的特异性补体体现了存在于环境中的营养物及其浓度的作用。后者是重要的因素，因为当高浓度的营养物存在时，特异营养物的运输通常借助于一种类型的转运蛋白，而当低浓度的营养物存在时，特异营养物的运输则是通过不同类型的、高亲和性的转运蛋白。

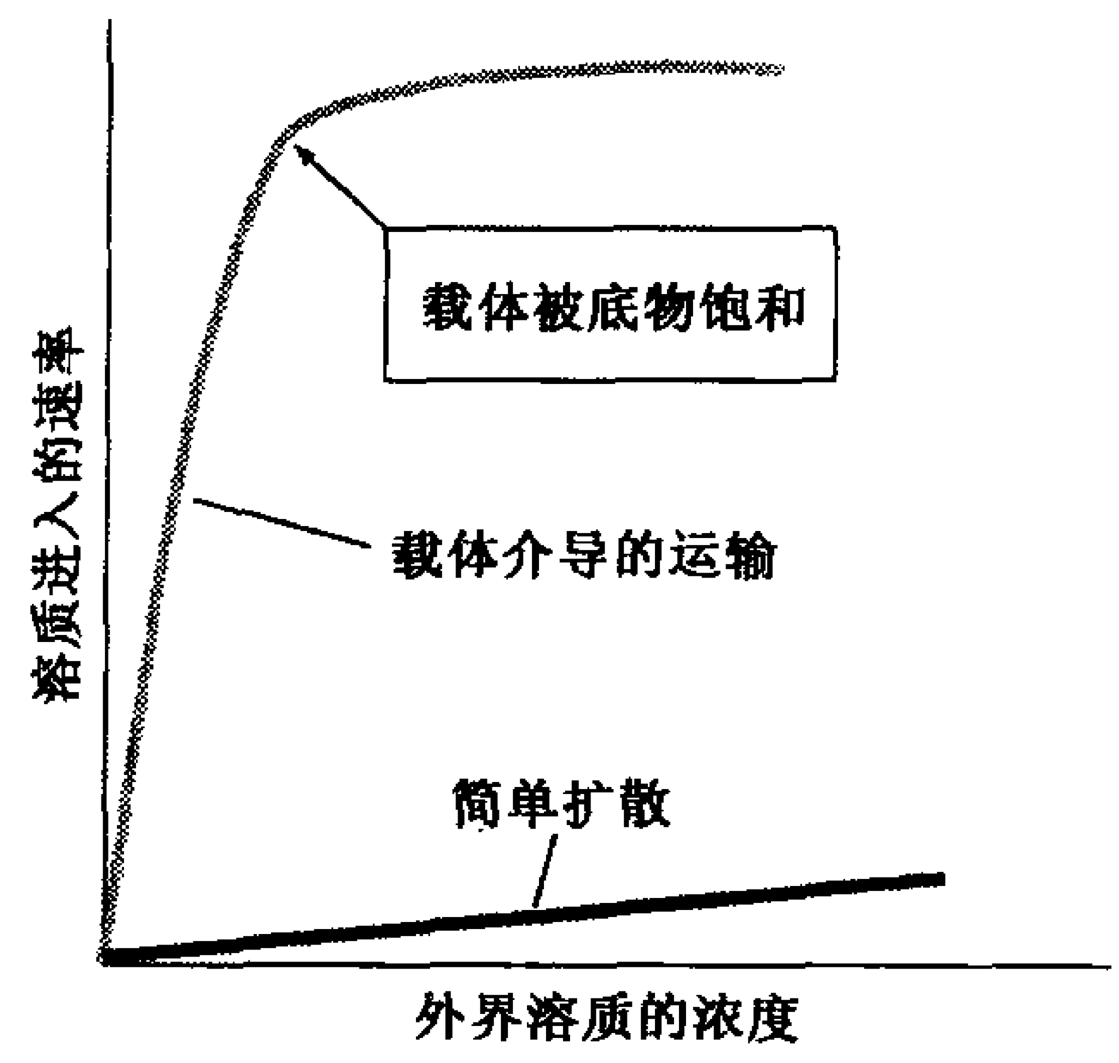


图 4.21 扩散和运输中吸收率与外界浓度之间的关系。注意在相对较低的外界浓度下，载体介导的过程中吸收率显示了饱和状态。

概念检查

细胞质膜的主要功能是作为渗透性屏障，阻止细胞质代谢物渗漏到环境中。选择性渗透也阻止多数溶质扩散。为了逆浓度梯度积累营养物，使用了特异的运输机制。

◆ 除了渗透性，细胞质膜还具有什么其他功能?

◆ 列举两种原因为什么细胞不能依靠扩散作为细胞获得营养的手段?

◆ 对于细胞，为什么对细胞质膜的物理损伤是一个比对一些其他细胞组分的损伤更为关键的问题?

4.7 膜转运系统

正如所讨论的，营养物的转运和废物的排泄是主要的细胞生命活动。原核生物中涉及不同的转运机制，每种都有其各自独特的特点，现在我们来探讨这个问题。

膜转运蛋白的结构和功能

在原核生物中至少有三种转运物质的系统：简单转运（simple transport）、基团转位（group translocation）和 ABC 系统（ABC system）。简单转运只需要跨膜蛋白，基团转位在转运过程中涉及一系列蛋白质，ABC 系统涉及底物结合蛋白（substrate-binding protein）、膜转运蛋白（membrane transporter）和 ATP 水解蛋白（ATP-hydrolyzing protein）（图 4.22）。所有这些转运系统都需要能量，既有质子动力、ATP，也有其他一些富含能量的复合物。

实际上，所有细菌转运系统的跨膜蛋白在初级和二级结构上显示了明显的同源性，证实了它们具有共同的进化根源。在结构上，这些转运蛋白形成 12 个 α 螺旋（见 3.7

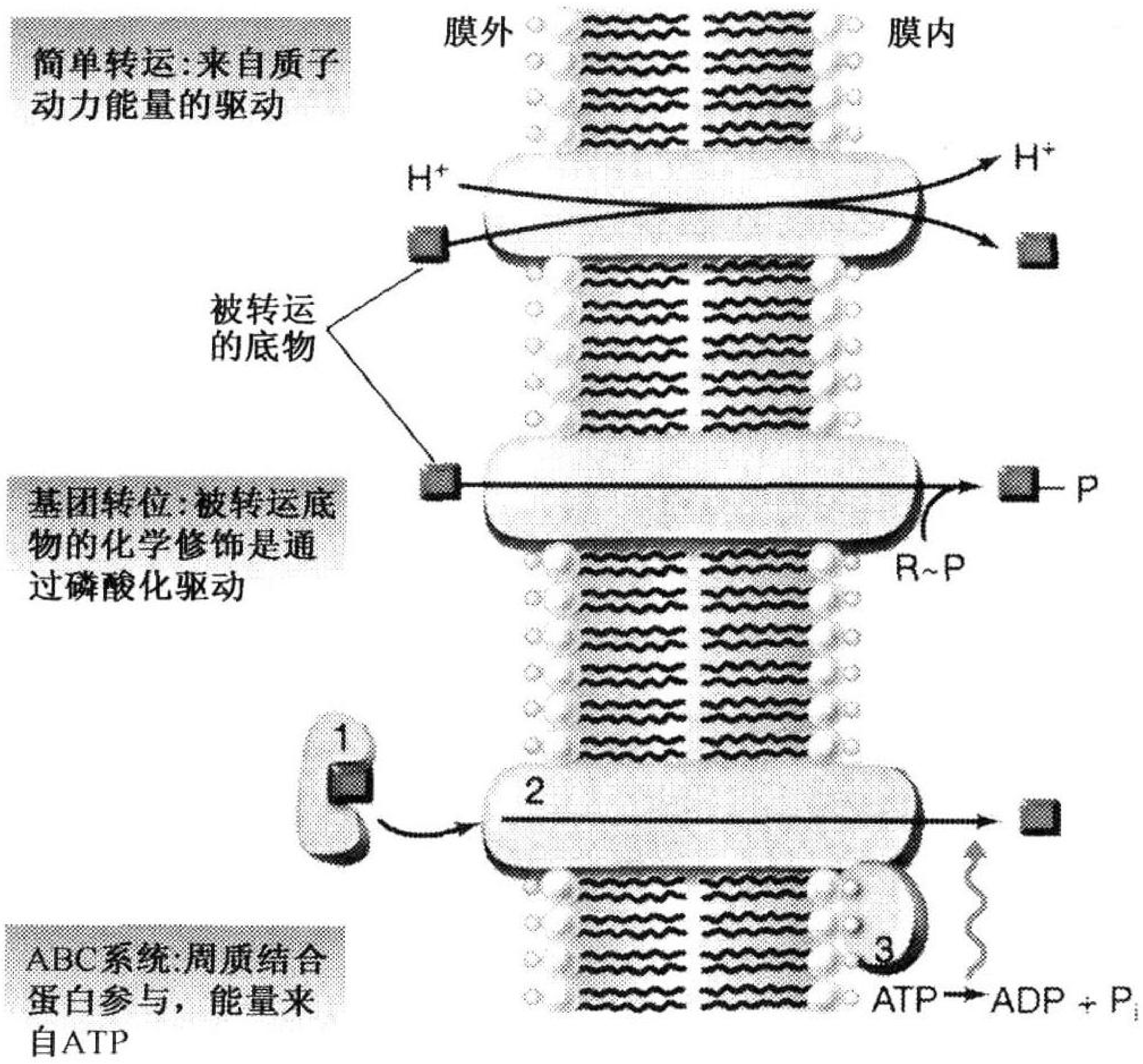


图 4.22 膜转运系统的三种类型。注意简单转运蛋白和 ABC 系统转运物质没有被化学修饰，而基团转运导致被转运物质被化学修饰（磷酸化）。ABC 系统的三个蛋白质标记为 1、2 和 3。

节）前后缠绕在膜上形成一个通道使被转运物质进入细胞（图 4.23）。实际的转运过程在蛋白质与其底物结合以后涉及一个构象的改变，这种改变运输复合物穿过膜的过程。

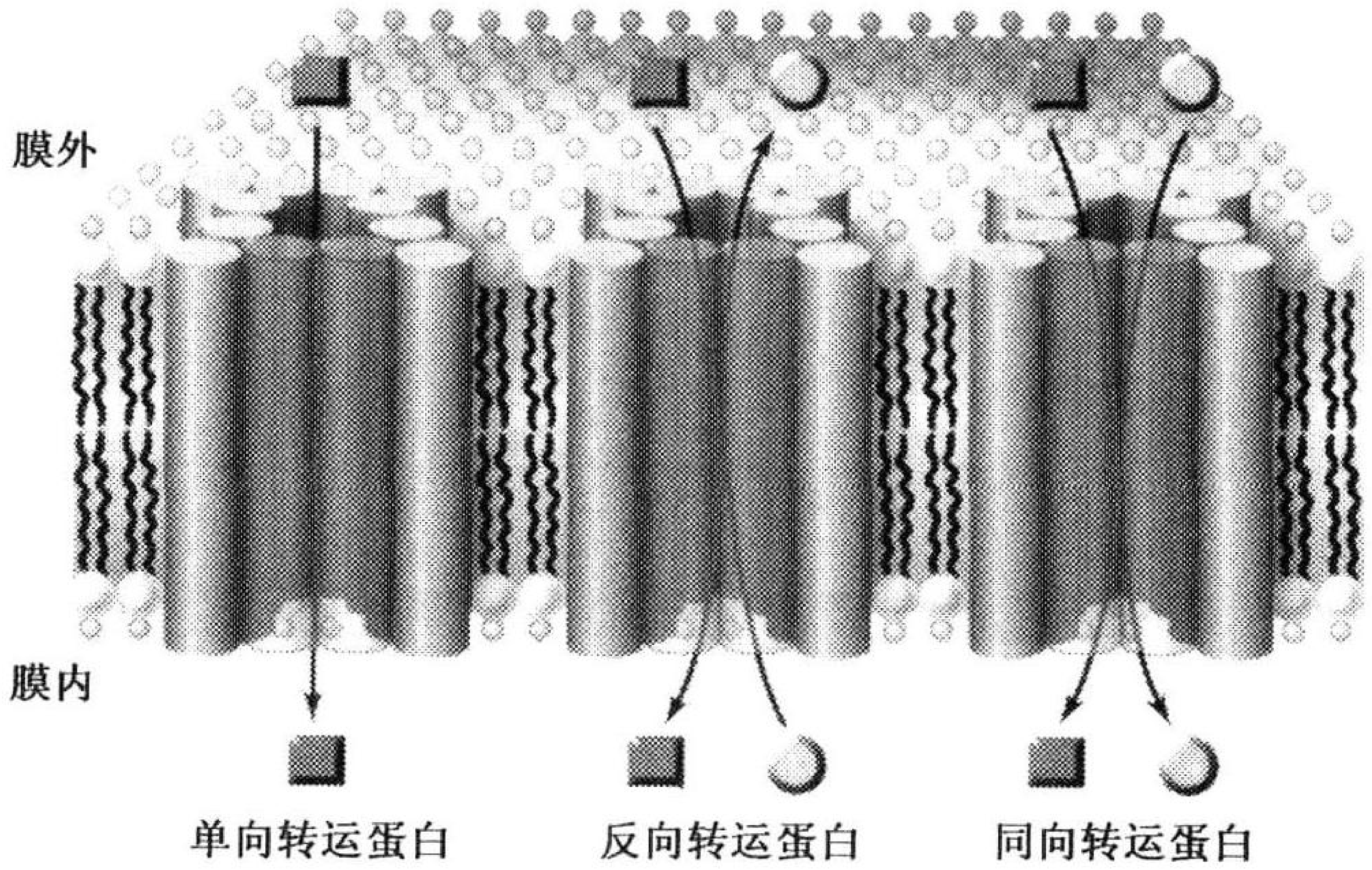


图 4.23 跨膜转运蛋白的结构和转运类型。在原核生物中，典型的跨膜转运蛋白含有 12 个 α 螺旋，每一个排列在一起组成一个圈，形成了一个穿膜的通道。这里所显示的是三个独立的转运蛋白，每一个显示一种不同类型的运输过程。反向转运蛋白和同向转运蛋白共同运输的分子用黄色显示。

至少已知三种类型的转运蛋白（图 4.24）。单向转运蛋白（uniporter）运输分子以单向方式穿过膜。同向转运蛋白（symporter）运输一种物质需与另一种物质一起运输，典型的例子是质子（H^+）的运输。反向转运蛋白（antiporter）从字面上看，就是以一个方向运输一种物质穿过膜，而向相反方向运输第二种物质（图 4.23）。

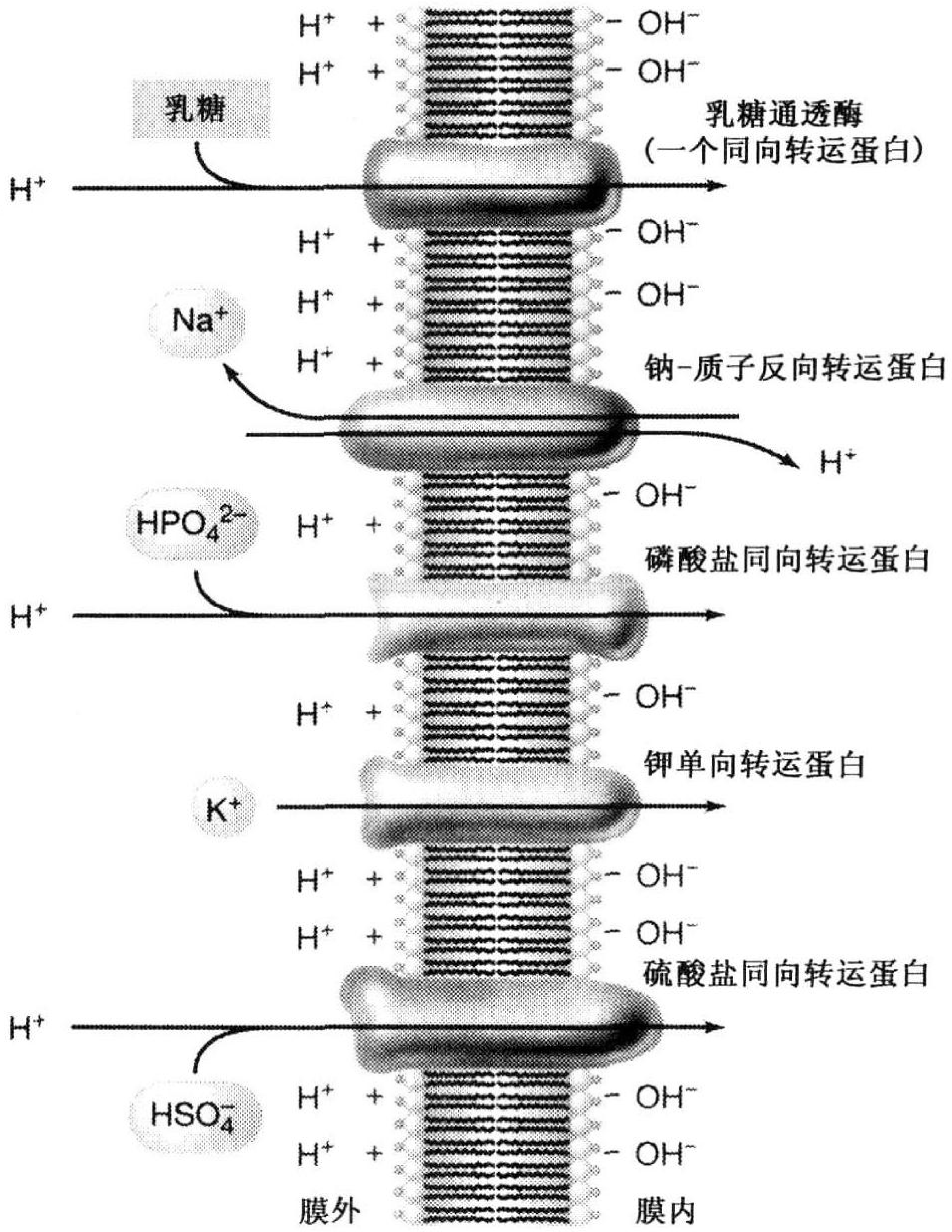


图 4.24　大肠杆菌（*Escherichia coli*）乳糖通透酶（同向转运蛋白）和几种其他特性清楚的简单转运蛋白的功能。尽管简化的跨膜蛋白在这里画为球形，但需注意的是实际上它们的结构应为图 4.23 所示。也应注意到同向转运蛋白和反向转运蛋白是由质子动力的能量驱动，后者是由细胞内产能（分解代谢）反应形成的。

大肠杆菌中乳糖的吸收：乳糖通透酶

细菌大肠杆菌代谢双糖——乳糖（lactose），是通过大肠杆菌细胞中的同向转运蛋白，即乳糖通透酶（Lac permease）的活性来实现的。乳糖通透酶是一种简单的转运蛋白，图 4.24 显示了同向转运蛋白的活性与其他简单转运蛋白的比较，包括它们作为单向转运蛋白或反向转运蛋白的功能。

乳糖通透酶需要能量，值得注意的是当乳糖分子被转运时，质子动力中的能量随着质子共转运到细胞而慢慢减弱。然而，质子动力通过细胞内产能反应重新建立起来，这些将在后面的章节进行讨论（见第 5 章和第 17 章）。乳糖通透酶活性的主要结果是使乳糖积累到足够高的浓度，导致其代谢可以产生为细胞可利用的能量。

基团转位：磷酸转移酶系统

基团转位是被转运的物质在跨膜过程中发生化学变化的运输过程。基团转位系统研究得最详尽的例子是大肠杆菌中的葡萄糖、甘露糖、果糖，这些物质在运输过程中先被

磷酸转移酶系统（phosphotransferase system）磷酸化。

磷酸转移酶系统由蛋白质家族组成，其中 5 种是转运任意糖类所必需的。在转运糖类以前，磷酸转移酶系统中的蛋白质在磷酸化和去磷酸化之间不断变化，直至一种称为酶Ⅱ$_c$的跨膜蛋白接受了磷酸基团并在转运过程中对糖磷酸化为止（图 4.25）。一种称为 HPr 的小型蛋白质，磷酸化 HPr 的酶（酶Ⅰ）和酶Ⅱ$_a$是细胞质蛋白，而酶Ⅱ$_b$位于内膜表面，酶Ⅱ$_c$是整合膜蛋白（图 4.25）。HPr 和酶Ⅰ是磷酸转移酶系统中非特异性组分，参与各种糖的吸收，而特异性酶Ⅱ只存在于某种个别糖的转运中（图 4.25）。

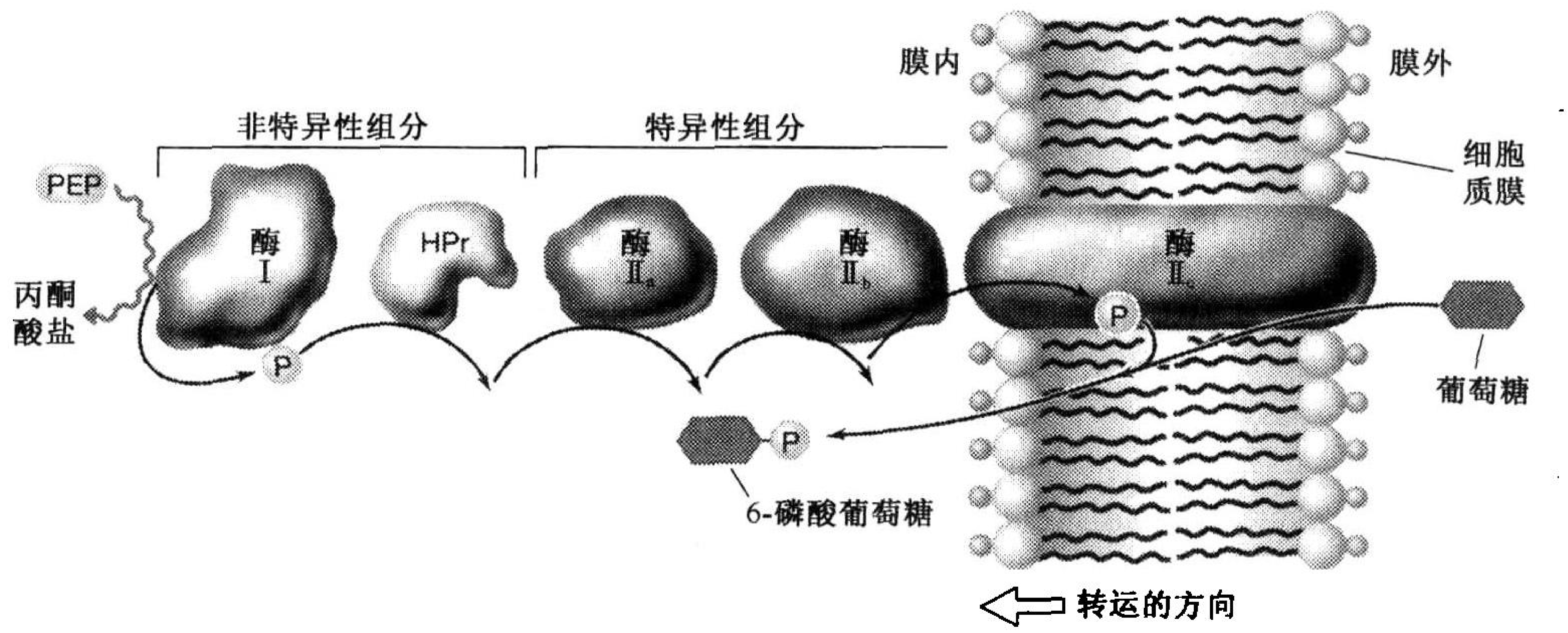


图 4.25 大肠杆菌（*Escherichia coli*）磷酸转移酶系统的机制。对葡萄糖的吸收，该系统由 5 个蛋白质组成：酶Ⅰ、酶Ⅱ$_a$、Ⅱ$_b$、Ⅱ$_c$ 和 HPr。从磷酸烯醇式丙酮酸到酶Ⅱ$_c$ 顺序发生磷酸转移，后者实际上转运（和磷酸化）糖。蛋白质 HPr 和酶Ⅰ是非特异的，参与所有糖的转运，酶Ⅱ组分特异性地参与特殊糖的转运。

磷酸转移酶系统所需的能量来源于富含能量的化合物——磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate），应该指出的是尽管在运输葡萄糖分子的过程中，能量是以富含能量的磷酸键形式被消耗（图 4.25），但是葡萄糖到 6-磷酸葡萄糖的磷酸化只是它在细胞内代谢的第一步（糖酵解，见 5.10 节），因此，磷酸转移酶系统为葡萄糖立即进入中心代谢途径做准备。

周质结合蛋白和 ABC 系统

我们将在本章后面（见 4.9 节）学习到，革兰氏阴性菌包含有一个在细胞质膜和富含脂质的外膜层之间称为周质的空间（periplasm）（图 4.35）。周质含有各种不同的蛋白质，其中许多蛋白质具有转运功能，这些蛋白质称为周质结合蛋白（periplasmic-binding protein）。这种类型的转运系统实际上具有三部分：①周质结合蛋白；②跨膜蛋白；③ATP 水解蛋白（激酶）。后者提供了必要的能量。

这种类型的转运蛋白被称为 ABC 转运系统（ABC transport system），ABC 代表 ATP 结合盒（ATP-binding cassette）（图 4.26）。在原核生物中已鉴定了 200 多种不同的 ABC 转运系统，对其结构的研究表明它们是一个相关蛋白的家族。ABC 转运蛋白参与有机营养物（如糖和氨基酸）、各种无机营养物（如硫酸盐和磷酸盐）及痕量元素的运输。

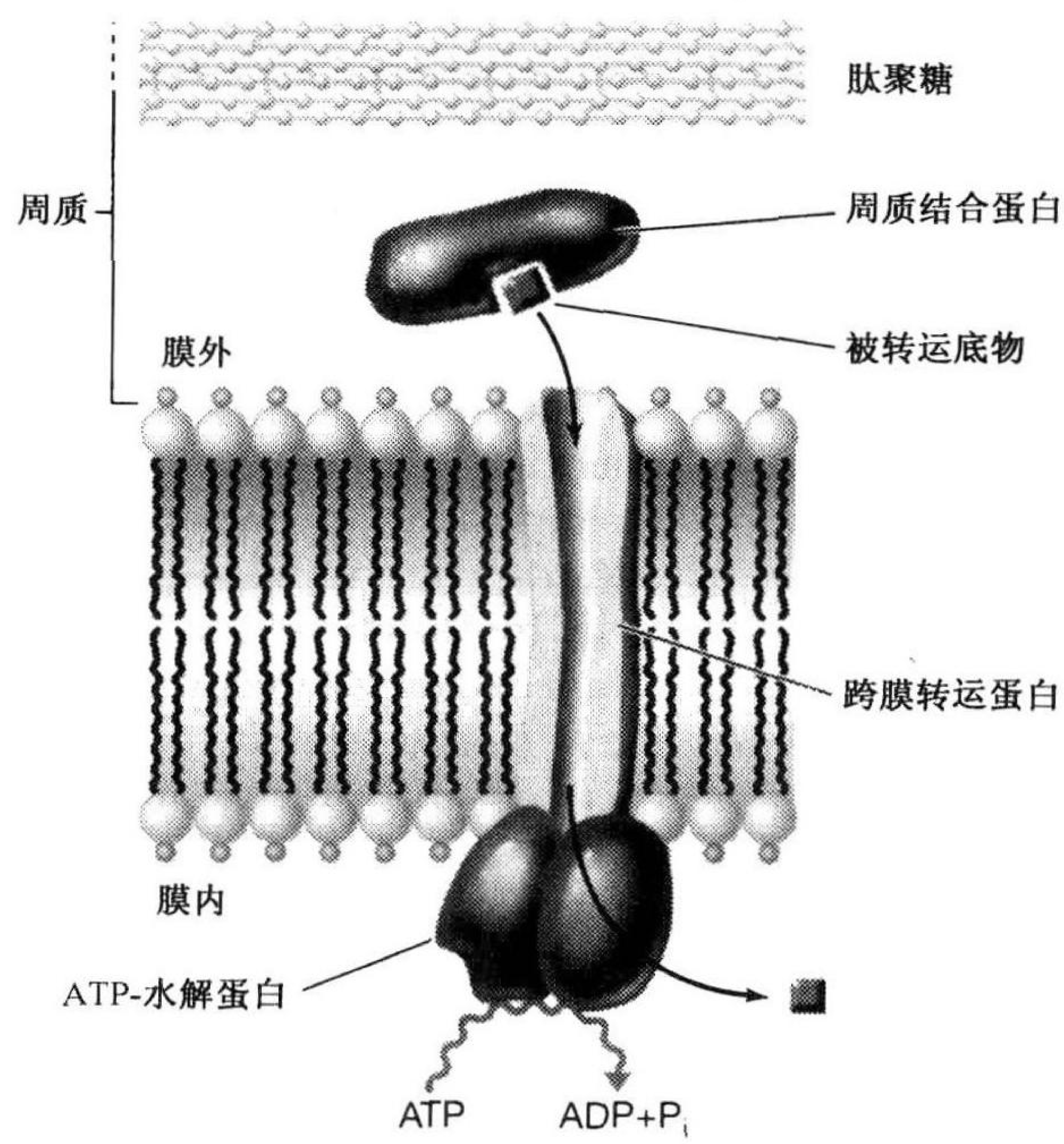


图 4.26 ATP 结合盒（ABC 型）转运蛋白机制。 周质结合蛋白对底物具有较高的亲和性；跨膜蛋白是运输通道，细胞质 ATP 水解蛋白为转运过程提供能量。在大肠杆菌中，麦芽糖（双糖）转运系统是 ABC 系统的一个例子。我们将在 4.9 节讨论革兰氏阴性菌细胞壁结构，包括周质。

ABC 型转运系统一个有趣的特性是周质结合蛋白具有相当高的底物亲和性。这些蛋白质能够在周质中移动并结合底物，即使底物以极低的浓度存在。例如，小于或等于 1μm（10^{-6}mol/L）的底物浓度能够很容易地被周质结合蛋白结合并转运。一旦被捕获，复合物将与各自的跨膜组分相互作用，ATP 的能量将驱动实际的转运过程（图 4.26）。

有趣的是，尽管革兰氏阳性菌缺少周质，但是在许多生物体内也发现了结合蛋白依赖型转运系统。然而，在革兰氏阳性菌中，特异性结合蛋白不能移动，而是锚定在细胞质膜上。尽管如此，像革兰氏阴性菌一样，一旦这些结合蛋白与底物结合，便与跨膜组分互相作用，依靠 ATP，转运底物穿过细胞膜。

蛋白质输出

目前我们讨论转运主要集中在小分子上，那么像蛋白质这样的大分子是如何转运的呢？严格的从功能上讲，许多蛋白质需要被转运出细胞质膜或者通过特定的途径插入到膜内。原核细胞中的蛋白质转运通过一种称为移位酶（translocase）的蛋白质作用，这种移位酶在 Sec（Secretory）系统中起着重要的作用。

例如，SecYEG 是一种膜介导的移位酶，在输出某些蛋白质的同时，以特定方向将与其功能相一致的其他蛋白质插入膜中。一些移位酶在输出的蛋白质类型上具有特异性，但 SecYEG 广泛地分布在原核生物中，并且可以转运各种不同的蛋白质。如何识

别被指定转运的蛋白质，我们将在后面的章节中讨论（见 7.17 节）。

蛋白质输出对细菌非常重要，因为很多细菌酶的功能在胞外（胞外酶）。例如，胞外水解酶（如淀粉酶和纤维素酶）直接分泌到环境中，分别分解淀粉或纤维素为葡萄糖（图 3.6b），然后葡萄糖作为碳源和能源被细胞利用。此外，许多病原细菌通过感染分泌蛋白毒素或其他有害蛋白质到寄主体内。所有这些大分子都需要移动穿过细胞质膜，由类似于 SecYEG 的移位酶协助它们转运。

概念检查

至少已知 3 种类型的转运蛋白：简单转运蛋白、磷酸转移酶型转运蛋白和 ABC 系统，后者含有 3 种互相作用的组分。转运需要来自于质子动力、ATP 或高能化合物的能量。

◆ 比较简单转运蛋白、磷酸转移酶系统和 ABC 系统的能量需求。

◆ 比较 3 种转运系统在转运分子过程中的化学改变。

◆ 哪种转运系统最适宜转运环境中存在的极低浓度的营养物，为什么？

◆ 蛋白质是如何运出细胞的？

4.8 原核生物的细胞壁：肽聚糖和相关分子

细菌细胞含有较高浓度的溶质，由此形成一个相当大的膨压，如 *E. coli* 的膨压约为 2 个大气压，这大概与汽车轮胎内的压力是一样的。细菌细胞壁（cell wall）除了抵抗这种压力外，还具有维持细胞形状和硬度的功能。

细菌可分成两大类，即革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。区分这两类细菌可根据革兰氏染色（Gram stain）（见 4.1 节）。细胞壁结构的不同是革兰氏染色反应的核心。正如图 4.27 所显示的，这两类细菌的细胞壁表面在电子显微镜下有很大不同，革兰氏阴性菌细胞壁是多层结构，非常复杂，而革兰氏阳性菌细胞壁由单层结构组成，通常相当厚。

这一节主要讨论原核生物细胞壁的多糖组分，包括细菌和古生菌。这些多糖尤其是指肽聚糖及古生菌中一些相关的和不相关的多糖。在 4.9 节中我们将描述在革兰氏阴性菌中发现的这种特殊的细胞壁组分。

肽聚糖

细菌细胞壁中有一坚硬的层，主要用于支撑胞壁。革兰氏阴性菌中，在这层坚硬物质外面还存在其他的层。革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌的坚硬层在化学组成上很相似，肽聚糖（peptidoglycan）这种多糖由两种糖的衍生物，即 *N*-乙酰葡萄糖胺（*N*-acetylglucosamine）和 *N*-乙酰胞壁酸（*N*-acetylmuramic acid）及少量特殊氨基酸［即 L-丙氨酸、D-丙氨酸、D-谷氨酸及赖氨酸或二氨基庚二酸（diaminopimelic acid，DAP)］（图 4.28）组成。这些组分联结而形成重复结构，即四肽聚糖（glycan tetrapeptide）（图 4.29）。

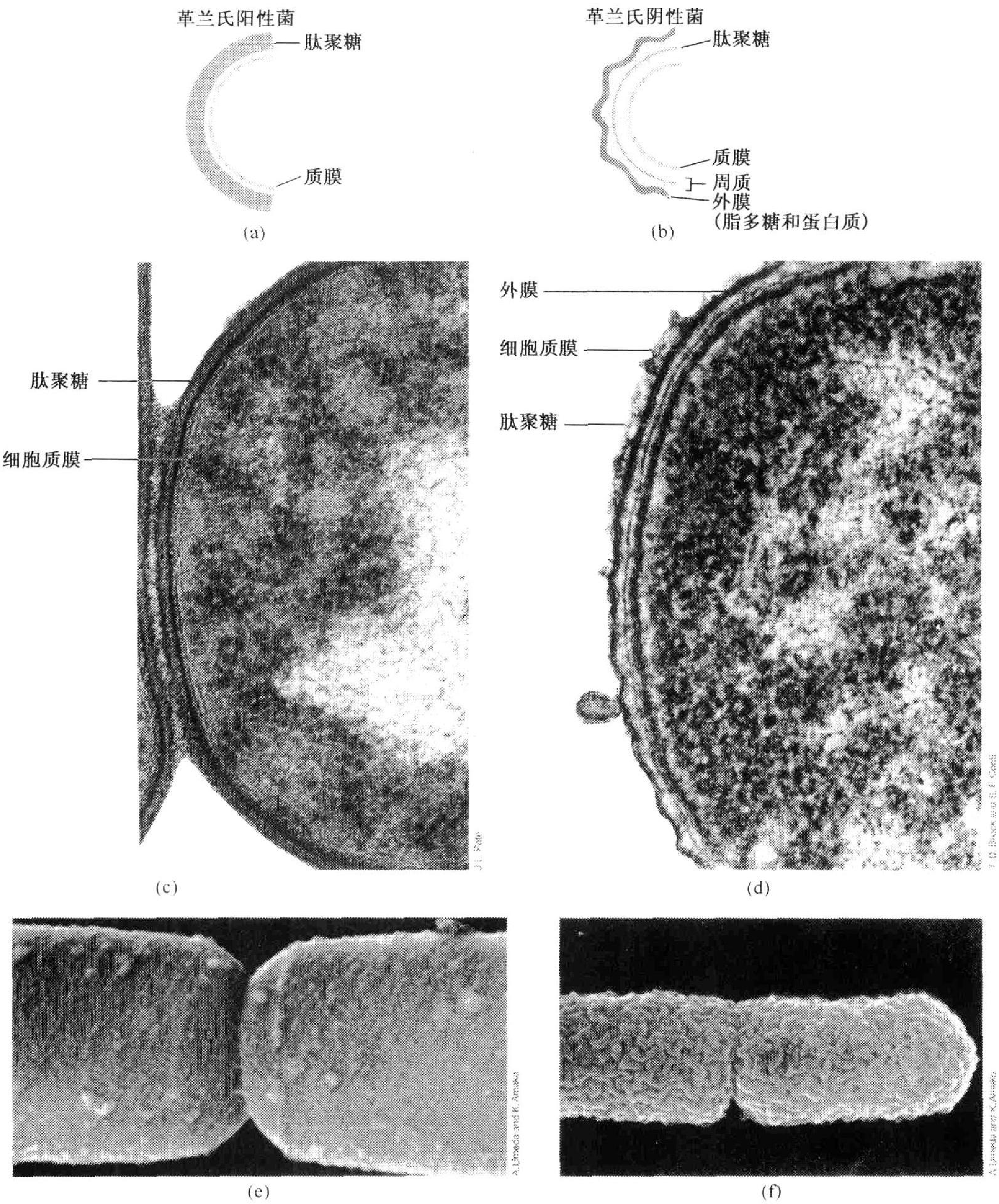


图 4.27　细菌细胞壁。（a，b）革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁示意图。（c）革兰氏阳性菌成晶节杆菌（*Arthrobacter crystallopoietes*）细胞壁的电镜照片。（d）革兰氏阴性菌毛霉亮发菌（*Leucothrix mucor*）细胞壁电镜照片。（e，f）革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌和革兰氏阴性菌大肠杆菌的扫描电镜照片。注意（e）和（f）显示的细胞表面结构。枯草芽孢杆菌或大肠杆菌单个细胞直径约 1μm。

肽聚糖的基本结构是一个围绕细胞的一个接一个肽聚糖链形成的片层结构，由聚糖链形成的片层与氨基酸形成的四肽交联联结起来。聚糖链中连接糖分子的糖苷键非常

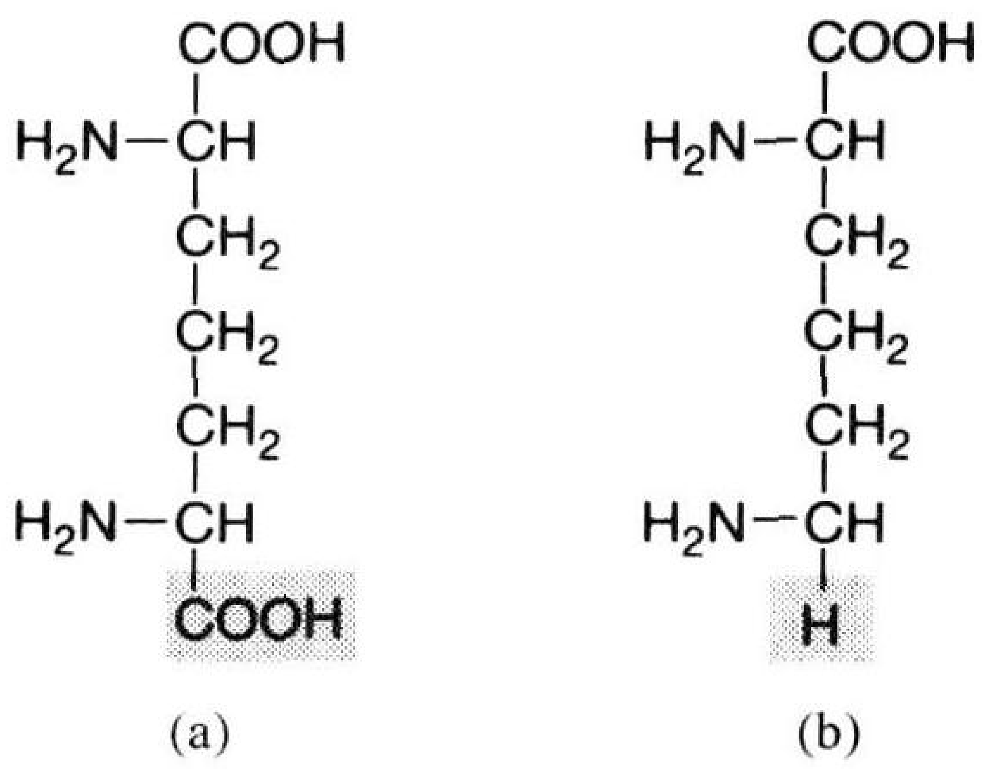


图 4.28 肽聚糖中交联氨基酸。(a) 二氨基庚二酸。(b) 赖氨酸。用红色标出了两种分子的唯一不同。除了这两种氨基酸，在肽聚糖的交联中还发现了几种其他的氨基酸。

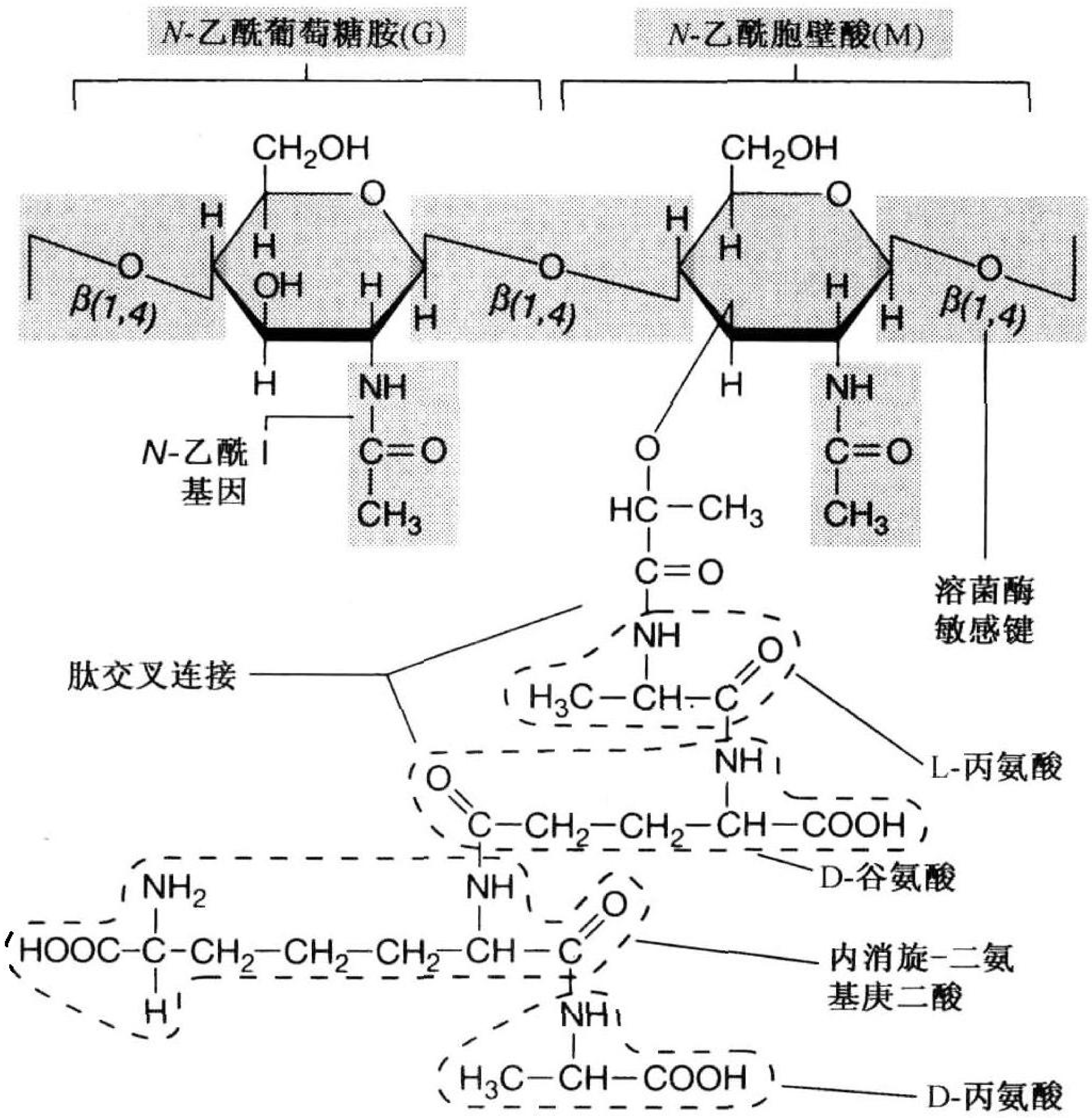


图 4.29 肽聚糖细胞壁结构中一个重复单位的结构，四肽聚糖。在大肠杆菌和其他多数革兰氏阴性菌中发现该结构。在某些细菌中，也发现了其他氨基酸。

强，但是单独的这些链不能提供所有方向的刚性，只有当这些链被氨基酸交联联结起来时，肽聚糖结构的全部力量才显现出来。这种交联联结的方式在不同细菌中有不同的特点，交联联结越完全刚性越强。

在革兰氏阴性菌中，由二氨基庚二酸的氨基通过肽键与末端 D-丙氨酸的羧基进行交联（图 4.30a)。在革兰氏阳性菌中，交联借助于肽桥（peptide interbridge）的方式，交联氨基酸的种类和数量在不同生物体中是不同的。例如，金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）是研究较清楚的革兰氏阳性菌，肽桥是由 5 分子的甘氨酸组成（图 4.30b)。完整的肽聚糖分子结构见图 4.30c。

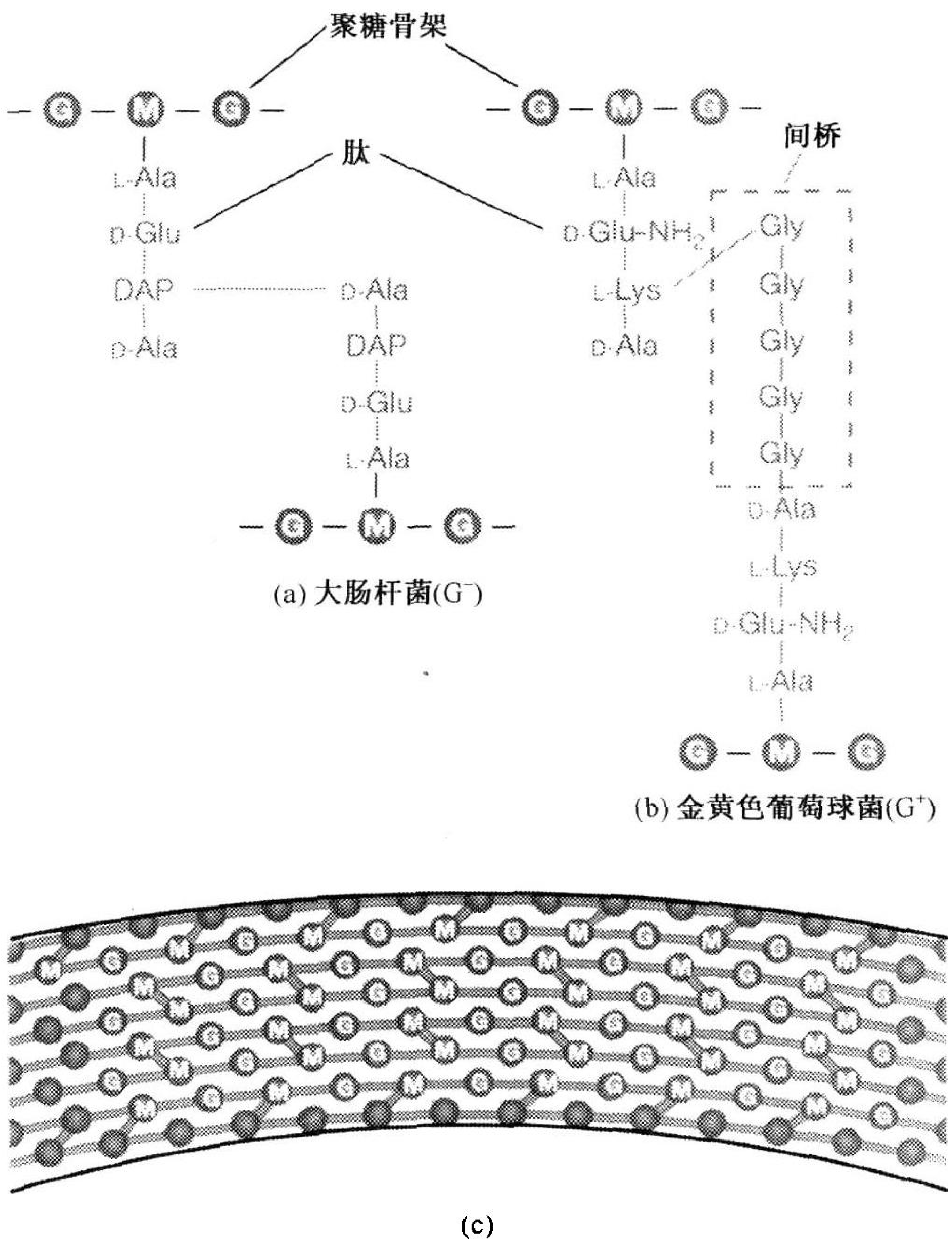


图 4.30　大肠杆菌（*Escherichia coli*）和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）中肽和聚糖单位是如何连接而形成肽聚糖片层的。（a）大肠杆菌和其他革兰氏阴性菌不存在肽桥。（b）金黄色葡萄球菌（革兰氏阳性菌）中的甘氨酸肽桥。（c）肽聚糖的一般结构。G 为 *N*-乙酰葡萄糖胺；M 为 *N*-乙酰胞壁酸。

革兰氏阳性菌中，细胞壁的 90% 由肽聚糖组成，但也存在着少量另一种称为磷壁酸（teichoic acid）的分子（后面章节讨论）。虽然一些细菌只有一层肽聚糖包围细胞，但许多细菌尤其是革兰氏阳性菌由几层（最多可达约 25 层）肽聚糖层相互堆叠而成。在革兰氏阴性菌中，肽聚糖只占细胞壁的 10%，大部分细胞壁正如 4.9 节所讨论的，由外膜层组成。但是不论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌，它们的细胞形状取决于肽聚糖链的长度及交联的方式和范围。

肽聚糖的多样性

肽聚糖只存在于细菌的种属中，在古生菌和真核生物的细胞壁中从未发现过糖 *N*-乙酸胞壁酸和氨基酸二氨基庚二酸（DAP）。并不是所有细菌的肽聚糖中都有 DAP，这种氨基酸只存在于所有的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的某些种中，而大多数革兰氏阳性球菌具有赖氨酸而无 DAP（图 4.30b），还有一些其他革兰氏阳性菌具有其他的氨基酸。肽聚糖另一个独特的特征是具有 D 构型氨基酸，即 D-丙氨酸和 D-谷氨酸。正如我

们在第 3 章已知的，细胞蛋白质中的氨基酸通常都是 L 构型的（见 3.6 节）。

目前已知 100 多种不同的肽聚糖类型，都在肽桥上发生变化。每一种不同的肽聚糖结构中的聚糖部分是一致的，只有 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸这两种糖，并且这些糖总是以 β-1,4-糖苷键连接（图 4.29）。重复单位的四肽只有一个氨基酸表现出变化，即赖氨酸和二氨基庚二酸交替转换。但是在一些生物体中 D-谷氨酸可以在 2 位发生羟基化，在其他一些种类中还会发现 1、3 位氨基酸的替换。四肽中存在的任何一种氨基酸也可出现在肽桥中，除此之外还有许多其他氨基酸也在肽桥中出现，如甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸和天门冬氨酸。但是有一些氨基酸从未在肽桥中发现，如支链氨基酸、芳香族氨基酸、含硫氨基酸、组氨酸、精氨酸及脯氨酸（图 3.12）。

因此，虽然肽聚糖中肽化学性质不同，但肽聚糖的骨架——葡萄糖胺和胞壁酸的交替重复，在所有种类的细菌中都是一样的。

磷壁酸和革兰氏阳性菌细胞壁概述

许多革兰氏阳性菌都有包埋在细胞壁中称为磷壁酸（teichoic acid）的酸性物质。磷壁酸一词包括所有含有磷酸甘油或核糖醇磷酸盐残基的壁、膜或荚膜多聚体。这些聚醇以磷酸酯连接，而且通常连接有其他糖类和 D-丙氨酸（图 4.31a）。因为磷壁酸带负电荷，所以部分地使整个细胞表面带负电荷。磷壁酸还具有结合二价阳离子（如 Ca^{2+}、Mg^{2+}）的功能，使其运输到细胞中。某些磷壁酸与膜脂质共价结合，因此称为脂磷壁酸质（lipoteichoic acid）。

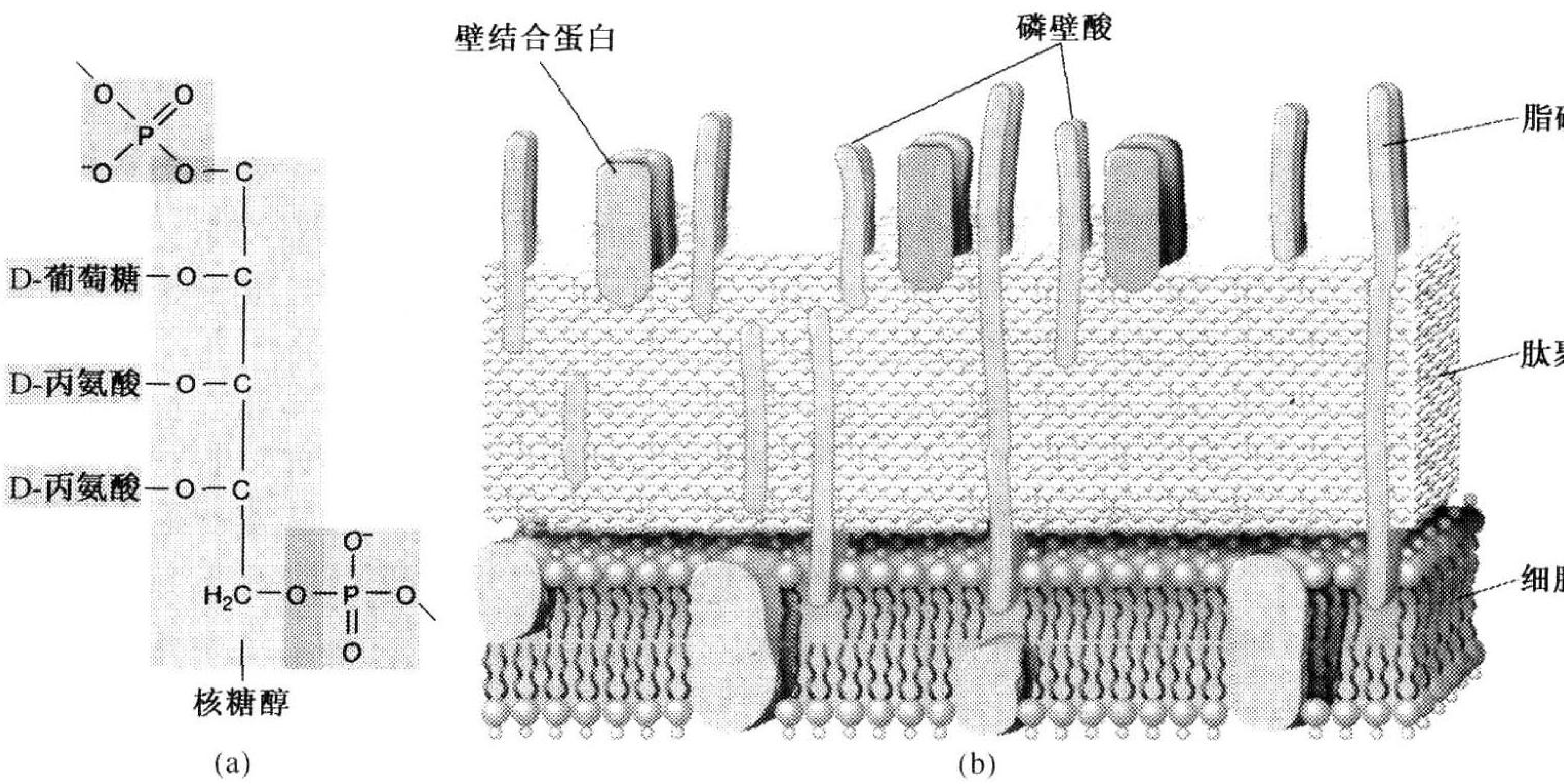
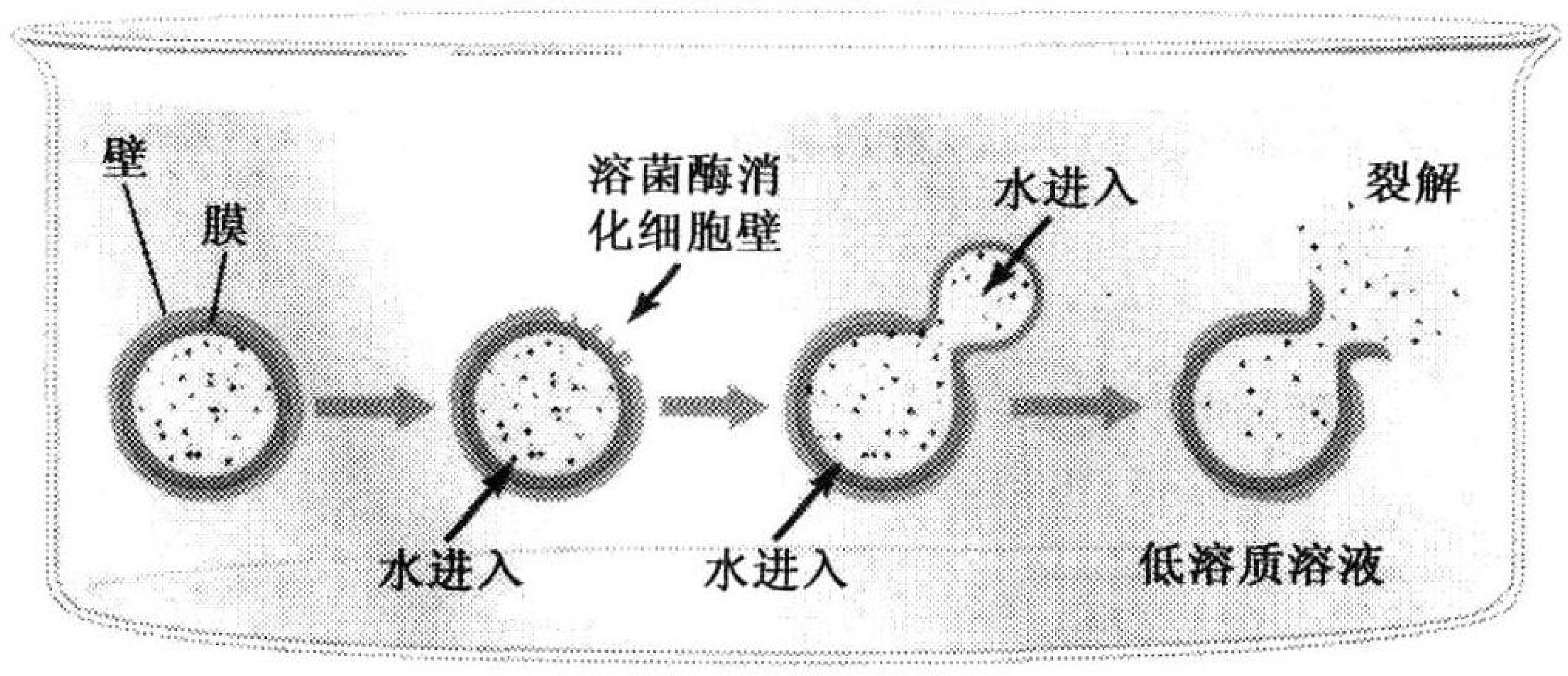


图 4.31 磷壁酸和革兰氏阳性菌细胞壁的一般结构。（a）枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）核糖醇磷壁酸结构，磷壁酸是核糖醇重复单位的多聚体。（b）革兰氏阳性菌细胞壁的概括图。

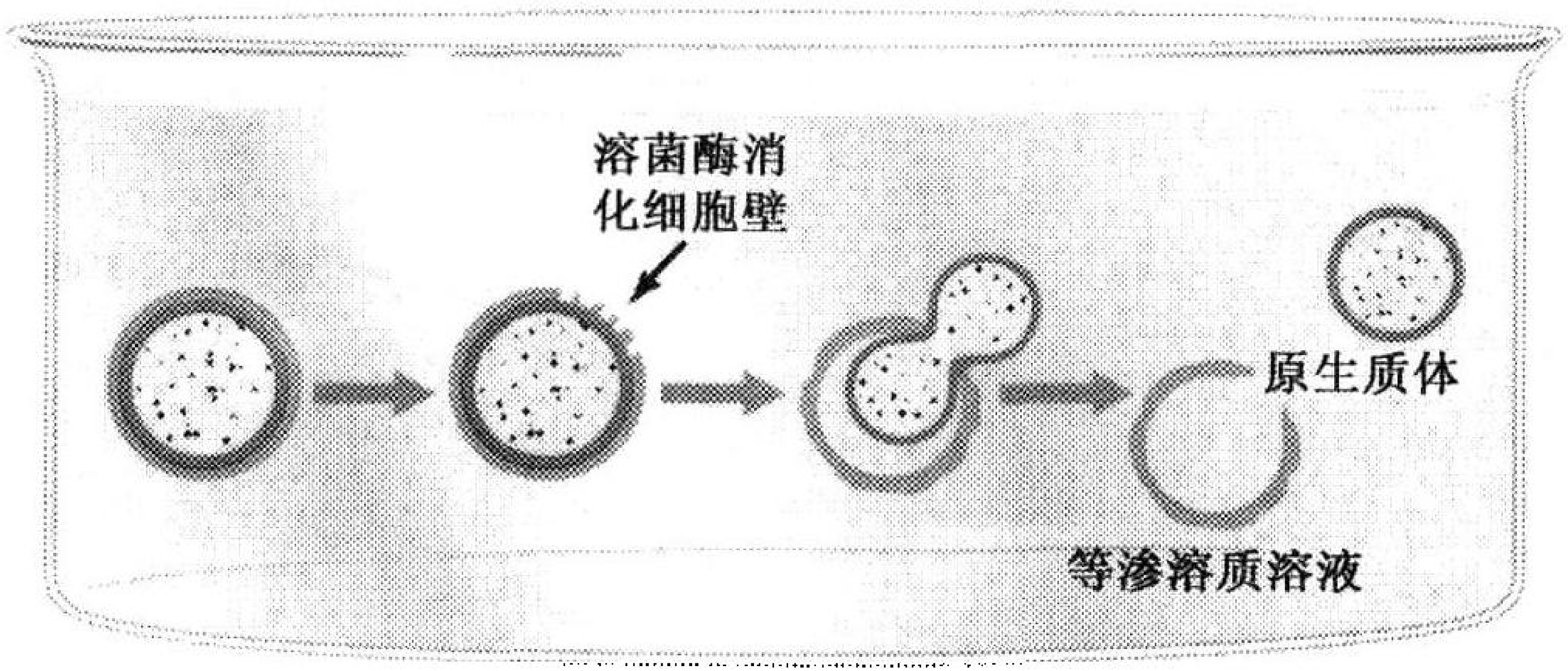
图 4.31b 概括了革兰氏阳性菌细胞壁的结构，说明了磷壁酸和脂磷壁酸质在细胞壁中是如何排列的。

无壁细胞

肽聚糖是可被某些物质破坏的某些种细菌中的重要分子。其中有一种酶称为溶菌酶(lysozyme)，这种蛋白质能够切断肽聚糖中连接 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸的 β-1,4-糖苷键（图 4.29)，以此来削弱细胞壁，然后水进入细胞，细胞膨胀，最终破裂，这个过程称为裂解（lysis）（图 4.32a)。溶菌酶可在动物的分泌物（包括泪水、唾液和其他体液）中发现，它的功能可能是作为抵抗细菌感染的一道主要防线。



(a)



(b)

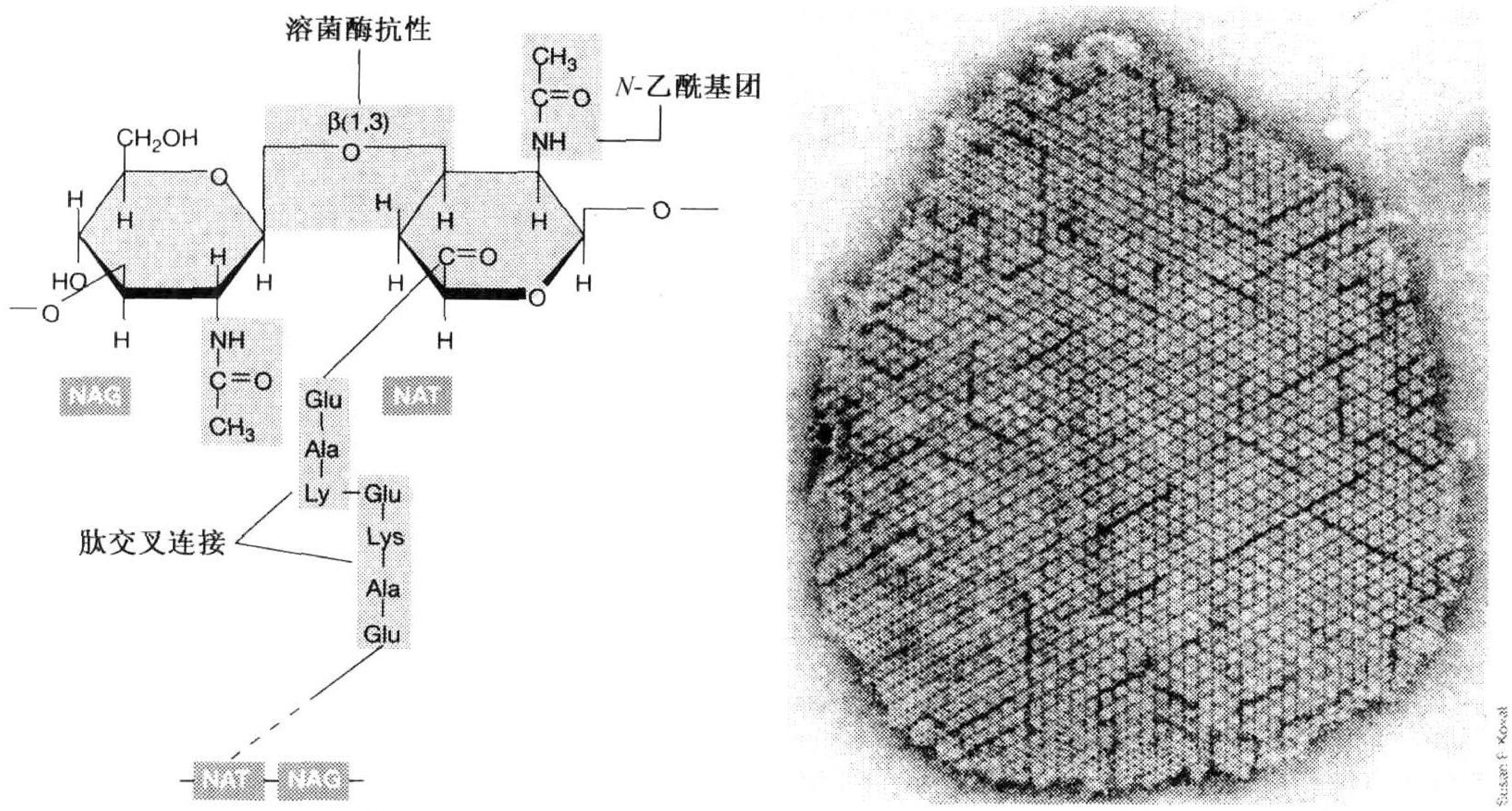
图 4.32 原生质体及其形成。(a) 在稀溶液中细胞壁破坏，释放原生质体，但由于细胞质膜在结构上非常脆弱，所以细胞立即溶解。(b) 在含有等渗浓度的溶质中（如蔗糖)，水不能进入原生质体，因此原生质体很稳定。溶菌酶切断肽聚糖中的 β-1，4-糖苷键（见图 4.29)。

如果将不能渗透细胞的溶质（如蔗糖）加入到细胞悬液中，则细胞内外溶质的浓度保持平衡（浓度为等渗的)。在这些条件下，溶菌酶仍能消化肽聚糖，但水不能进入细胞，裂解不会发生，因此可形成原生质体（protoplast） （细菌失去了细胞壁)(图 4.32b)。如果把这个在蔗糖溶液中稳定的原生质体放入水中，就会立即发生裂解作用。原生质球（spheroplast）常常被当作原生质体的同义词，尽管这两个词的意思有细微差别：原生质体一般没有细胞壁的残余物，而原生质球在包裹的膜结构上附着细胞壁碎片。

虽然大多数原核生物没有细胞壁不能存活，但有一些原核生物无细胞壁也能生存，其中包括能引起某些传染性疾病的支原体（mycoplasma）（见 12.21 节）和天然缺少细胞壁的古生菌热原体属（*Thermoplasma*)。这些原核生物是自由生活的原生质体，没有细胞壁也能存活，这或是因为它们具有独特的坚韧的膜，或是因为它们生活在具有等渗保护性的生境中，如动物体内。某些支原体的细胞膜中含有固醇，它增强了膜的刚性和韧性。

假肽聚糖、S层和古生菌的其他细胞壁

古生菌的某些种含有类似于肽聚糖的多糖细胞壁，这种物质称为假肽聚糖（pseudopeptidoglycan）（图 4.33a）。假肽聚糖的骨架由 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰塔罗糖胺糖醛酸（*N*-acetyltalosaminuronic acid）交替重复组成（后者代替了肽聚糖中的 *N*-乙酰胞壁酸）（比较图 4.29 与图 4.33a）。假肽聚糖骨架与肽聚糖的不同之处还在于以 β-1，3-糖苷键取代了真肽聚糖的 β-1，4-糖苷键（比较图 4.29 与图 4.33a）。



(a) (b)

图 4.33 假肽聚糖和 S 层。(a) 假肽聚糖结构，甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）细胞壁多聚体。注意与图 4.29 中显示的肽聚糖结构类似，特别是肽交联，这里 *N*-乙酰塔罗糖胺糖醛酸（NAT）残基代替了胞壁酸残基。NAG、*N*-乙酰葡萄糖胺。(b) 部分 S 层透射电镜照片，表明细胞壁的类结晶特性。显示的是原核生物蛇形水螺菌（*Aquaspirillum sperpens*）的 S 层（细菌的一员）；这个 S 层与古生菌中发现的许多 S 层一样是六角对称的。

其他古生菌的细胞壁缺少肽聚糖和假肽聚糖，而由多糖、糖蛋白或蛋白质组成。例如，甲烷八叠球菌属（*Methanosarcina*）的种含有很厚的多糖壁，由葡萄糖、氨基酸、半乳糖胺和乙酸组成。极端嗜盐古生菌如盐球菌属（*Halococcus*）含有类似于甲烷八叠球菌属的细胞壁，但含有硫酸盐（SO_4^{2-}）残基。

古生菌中最普遍的细胞壁类型是类结晶表面层（S 层）（S-layer）（在 4.10 节进一步讨论），S 层是由蛋白质或糖蛋白组成的，一般为六角对称。所有的古生菌种类都发现了 S 层，如极端嗜盐菌、产甲烷菌和超嗜热菌（见 2.5 节）。细菌的几个种在其外表面也具有 S 层（图 4.33b）。

从古生菌的种群中，我们看到各种细胞壁化学成分，从与肽聚糖很近似的分子到完全缺少多糖组分的细胞壁。除极少数特例外，所有古生菌都含有某一种类的细胞壁，古生菌细胞壁的功能与细菌一样，可阻止渗透裂解，并维持细胞形状。此外，因为它们的

细胞壁缺少肽聚糖，所以所有古生菌可天然地抵抗溶菌酶（见前面）和青霉素的作用，而这些试剂可破坏肽聚糖分子或阻止其合成（见 6.2 节）。

概念检查

细菌细胞壁含有一种称为肽聚糖的多糖，这种物质由 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸交替重复的链构成，后者与链之间以短肽交联。根据生物体的不同，存在着不同的肽聚糖层。古生菌细胞壁缺少肽聚糖，但其壁中含有其他多糖或蛋白质。溶菌酶可破坏细胞壁导致细胞裂解。

- ◆ 列出肽聚糖单体组分。
- ◆ 为什么肽聚糖是一种结实的大分子？
- ◆ 没有细胞壁的细胞如何生活？
- ◆ 假肽聚糖与肽聚糖的相似性与不同点？

4.9 革兰氏阴性菌的外膜

除了肽聚糖，革兰氏阴性菌还有另外一层壁，即外膜（outer membrane）。该层是第二个脂双分子层，但它不像细胞质膜仅由磷脂和蛋白质构成（图 4.16），外膜还含有多糖。外膜中的脂类和多糖紧密相连形成了脂多糖复合物（lipopolysaccharide complex）。因此，外膜通常称为脂多糖层（lipopolysaccharide layer）或简称 LPS。

LPS 层的化学性质

尽管 LPS 很复杂，但一些细菌 LPS 的化学性质现在已经了解得很清楚了。从图 4.34 可以看出脂多糖的多糖部分由两部分组成：核心多糖（core polysaccharide）和 *O*-多糖（*O*-polysaccharide）。在研究得比较彻底的沙门氏菌属（*Salmonella*）的脂多糖中，核心多糖由酮脱氧辛糖酸（ketodeoxyoctonate，KDO）、七碳糖（庚糖）、葡萄糖、

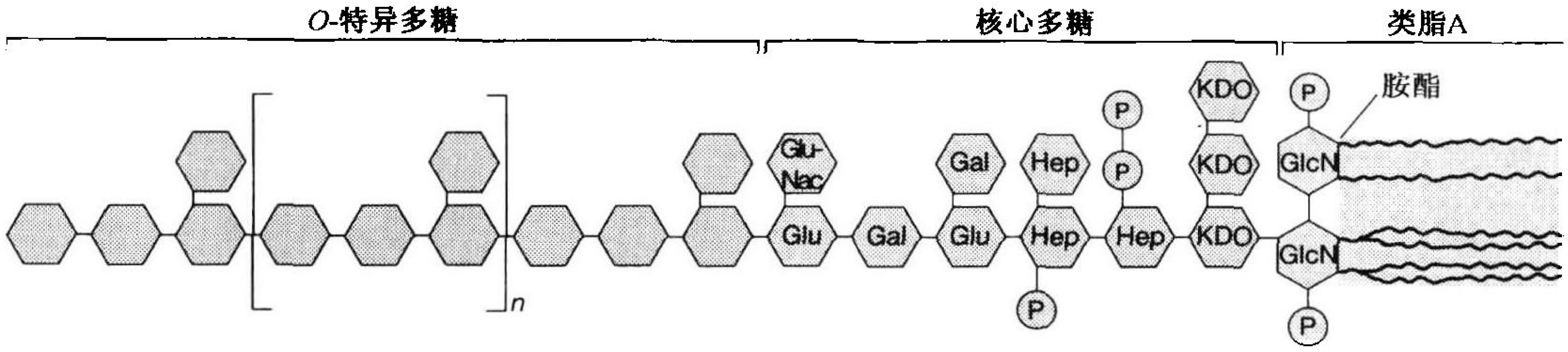


图 4.34　革兰氏阴性菌脂多糖结构。在不同种的革兰氏阴性菌中类脂 A 和多糖精确的化学组成不同，但它们主要组成的顺序（类脂 A-KDO-核心-*O*-特异）是基本一致的。在不同的种中，*O*-特异的多糖有较大的变化。KDO，酮脱氧辛糖酸；Hep，庚糖；Glu，葡萄糖；Gal，半乳糖；GluNac，*N*-乙酰葡萄糖胺；GlcN，葡萄糖胺；P，磷酸盐。葡萄糖胺和类脂 A 由胺酯键连接，LPS 层类脂 A 部分对动物是有毒的，组成了内毒素化合物（见 21.12 节）。比较图 4.35 和图 4.36，注意图 4.34 和图 4.35 中 LPS 层红色编码的不同部分。

半乳糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成。与核心相连的是 *O*-特异多糖（*O*-specific polysaccharide），主要含有半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖（都是六碳糖），以及一种或几种独特的双脱氧糖，如β-脱氧岩藻糖、可立糖、泊雷糖或泰威糖，这些糖连接成 4 或 5 分子的序列，常常是分支的，当这些糖序列不断重复时，就形成了长的 *O*-多糖。

图 4.35 显示了 *O*-多糖与 LPS 层其他部分的关系。脂多糖的脂类部分指的是类脂 A（lipid A）（图 4.34），不是甘油酯，是脂肪酸通过胺酯键连接到以磷酸-*N*-乙酰葡萄糖胺组成的双糖上。该双糖通过 KDO 与核心多糖相连（图 4.34）。类脂 A 中发现的脂肪酸一般包括已酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸。

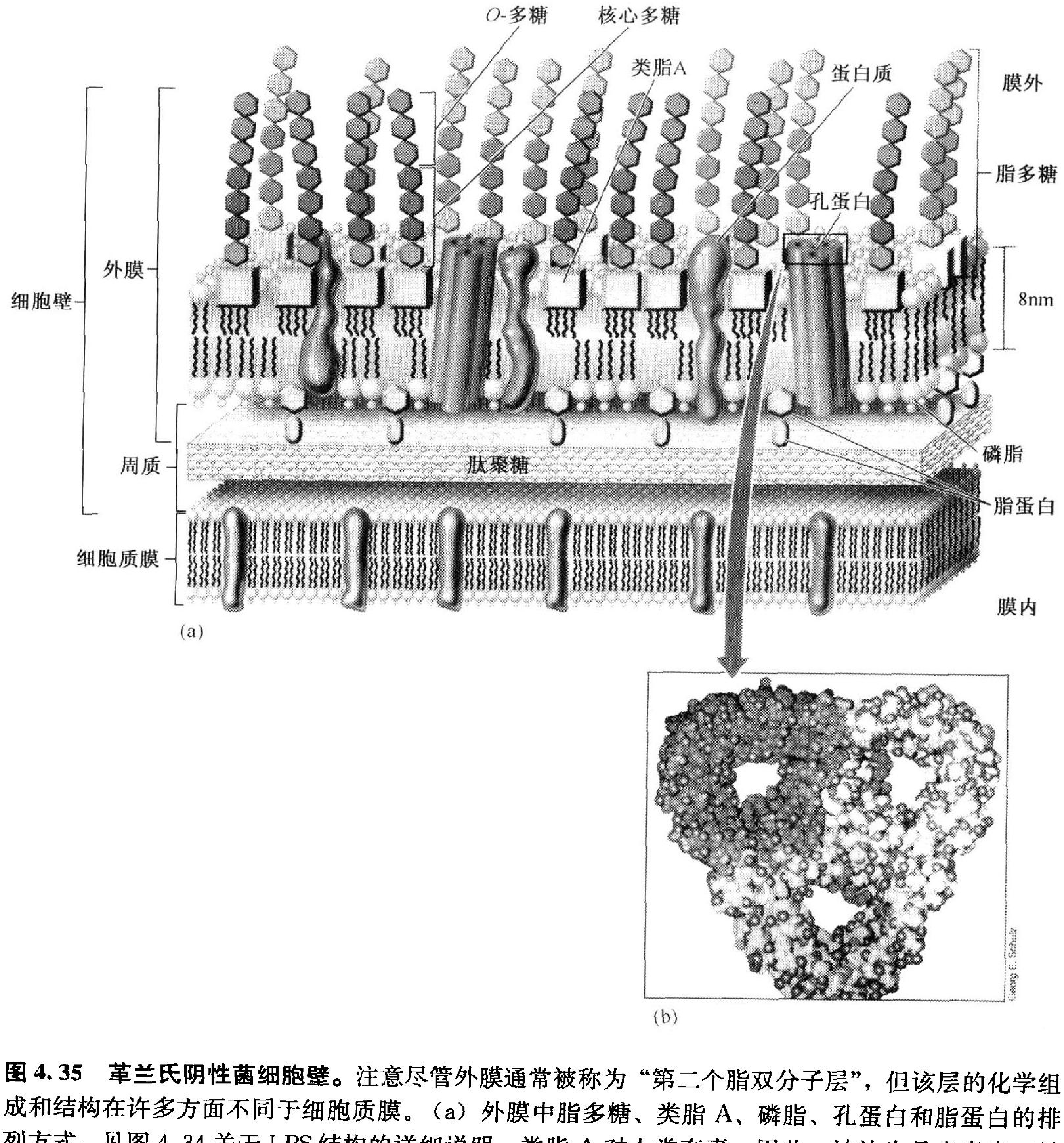


图 4.35 革兰氏阴性菌细胞壁。注意尽管外膜通常被称为“第二个脂双分子层”，但该层的化学组成和结构在许多方面不同于细胞质膜。（a）外膜中脂多糖、类脂 A、磷脂、孔蛋白和脂蛋白的排列方式，见图 4.34 关于 LPS 结构的详细说明。类脂 A 对人类有毒，因此，被认为是内毒素（见 21.12 节）。（b）孔蛋白的分子模型，注意存在 4 个孔，每一个孔是由一个孔蛋白分子形成，中间的孔是由孔蛋白之间形成的。该视野是垂直于膜平面的。模型是建立在研究生芽红细菌（*Rhodobacter blasticus*）孔蛋白的 X 射线衍射基础上。

在外膜中，脂多糖与一些蛋白质结合形成了膜的外叶。脂蛋白（lipoprotein）复合体发现于大量的革兰氏阴性菌脂多糖层的内叶（图 4.35a），脂蛋白的功能是作为外膜与肽聚糖之间的一个锚钩。最后，在外膜的外叶中，LPS 取代了磷脂，而磷脂仅在内叶中发现（图 4.35a）。因此，尽管外膜可以被认为是一种脂双分子层，但它的结构与细胞质膜的结构有很大不同（比较图 4.16 和图 4.35a）。

内毒素

尽管外膜主要是结构上的作用，但它的一个重要生物学特性是对动物有毒性。对人类及其他哺乳动物具有致病性的革兰氏阴性菌包括沙门氏菌属（*Salmonella*）、志贺氏菌属（*Shigella*）和埃希氏菌属（*Escherichia*）的一些种，这些病原体对宿主引发的一些症状就是源于它们的毒性外膜。

毒性与脂多糖层的部分尤其是类脂 A 有关。内毒素（endotoxin）就是指 LPS 的这个毒性部分，我们将在 21.12 节中讨论。一些内毒素导致人类的严重症状，包括胃肠不适（肠气、腹泻、呕吐）。内毒素是大量细菌性疾病的原因，特别是沙门氏菌食物感染（见 29.7 节）。有趣的是，一些非致病性细菌的 LPS 也表现出内毒素活性，因此这种生物本身虽然含有有毒的外膜成分，但没有致病性。

孔蛋白和周质

革兰氏阴性菌的外膜与细胞质膜不同，尽管它的基本结构也是脂双层，但只对小分子有相对的渗透性。这是因为有一种称为孔蛋白（porin）的蛋白质存在于外膜中，其功能是作为一个通道使亲水性的低分子质量物质得以进出（图 4.35）。已知几种不同的孔蛋白，包括特异性与非特异性两类。非特异性孔蛋白（nonspecific porin）形成“充水”的通道，任何小分子物质都可以通过。相反，一些孔蛋白具有高度特异性，是因为它们含有一种或一群结构相关物质的特异性结合位点。通过结构上的研究表明大多数孔蛋白含有 3 个相同的亚基，孔蛋白是穿膜蛋白（图 4.35a），联合起来在外膜形成直径约 1nm 的小孔（图 4.35b）。

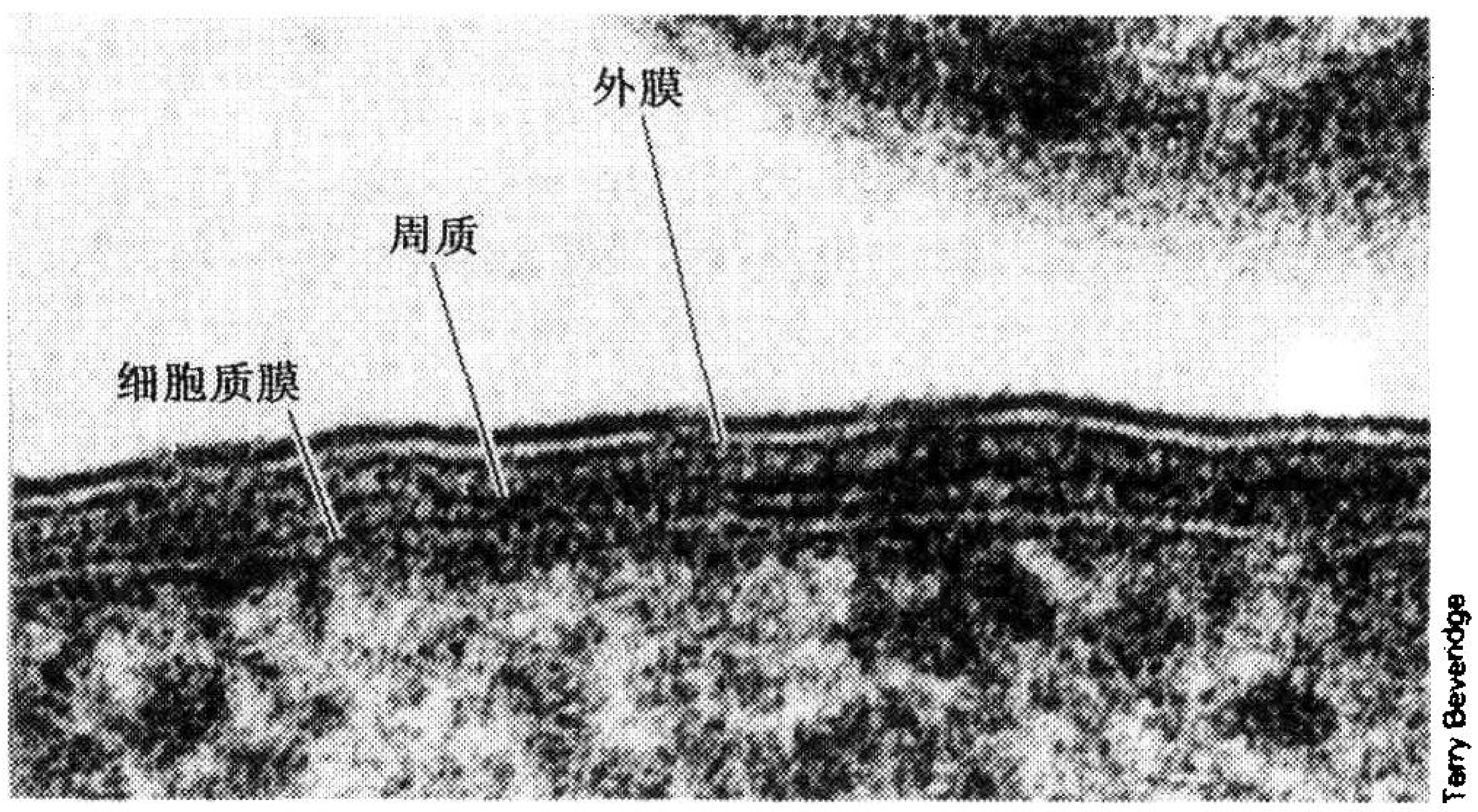


图 4.36 大肠杆菌细胞壁。高倍放大的大肠杆菌细胞外膜超薄切片，显示出由外膜和细胞质膜所包围的周质胶层。细胞质中大而黑的颗粒是核糖体。

尽管外膜可渗透小分子，但是对酶或其他大分子是不可渗透的。实际上外膜的一个主要功能就是保持蛋白质从细胞中扩散到细胞质膜外，这些酶所在的区域称为周质（periplasm）（图 4.35 和图 4.36）。这一区域位于细胞质膜外表面与外膜内表面之间，12～15nm 宽，周质的内含物呈均匀的胶状，在这里发现了大量的周质蛋白（图 4.36）。

根据生物体的不同，周质可以含有几种蛋白质，包括水解酶（hydrolytic enzyme），食物分子的初步消化相关蛋白；结合蛋白（binding protein），起始物质运输过程相关蛋白（见 4.7 节）；化学感受器（chemoreceptor），是与趋化性反应有关的蛋白质（见 4.16 节和 8.12 节）。如前所述，这些蛋白质的大部分是通过 SecYEG 系统转运到周质的（见 4.7 节）。

细胞壁结构与革兰氏染色的关系

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁结构上的差异被认为在革兰氏染色反应中有所不同。在革兰氏染色中（见 4.1 节），细胞内形成一种不溶性的结晶紫-碘复合物，这种复合物可以用乙醇从革兰氏阴性菌中抽提出来，但不能从革兰氏阳性菌中抽提出来（图 4.4）。正如我们所看到的，革兰氏阳性菌有由几层肽聚糖形成的很厚的细胞壁，能被乙醇脱水，导致壁上小孔关闭，从而阻止了不溶性结晶紫-碘复合物从细胞中逸出。相反，革兰氏阴性菌中乙醇很容易渗入富含脂质的外膜，将结晶紫-碘复合物从细胞中抽提出来。

概念检查

除了肽聚糖，革兰氏阴性菌还有一个由脂多糖、蛋白质和脂蛋白组成的外膜。称为孔蛋白的蛋白质与外膜的渗透性有关，膜之间的间隙是周质，其中含有与重要的细胞功能相关的各种蛋白质。

- ◆ 构成革兰氏阴性菌的 LPS 层的组分有哪些？
- ◆ 孔蛋白的功能是什么？它们位于革兰氏阴性菌细胞壁的何处？
- ◆ 细胞的什么组分具有内毒素特性？
- ◆ 为什么乙醇很容易使革兰氏阴性菌脱色，而革兰氏阳性菌不能？

Ⅲ 原核生物的表面结构和内含物

除了已经讨论过的细胞壁和相关的表面层外，一些原核细胞还有其他的外层或结构与环境保持联系。而且，许多细胞可以形成一种或多种细胞内含物，然后这些内含物作为营养源被代谢。这里我们讨论一些表面结构和细胞内含物。

4.10 细菌细胞的表面结构

原核生物能产生各种结构，它们可以附着在细胞表面或从细胞表面突出，包括菌毛、纤毛、S 层、荚膜和其他黏液层。我们现在讨论这些结构。

菌毛与性毛

菌毛（fimbriae）与性毛（pili）是细胞表面伸出的由蛋白质组成的短的丝状结构。某些病原菌的菌毛（图 4.37）能够使其附着在动物表面（包括其组织），在表面形成菌膜或生物膜（19.3 节）。众所周知的病原菌包括鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）（沙门氏菌病）、淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）（淋病）和百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）（百日咳）。

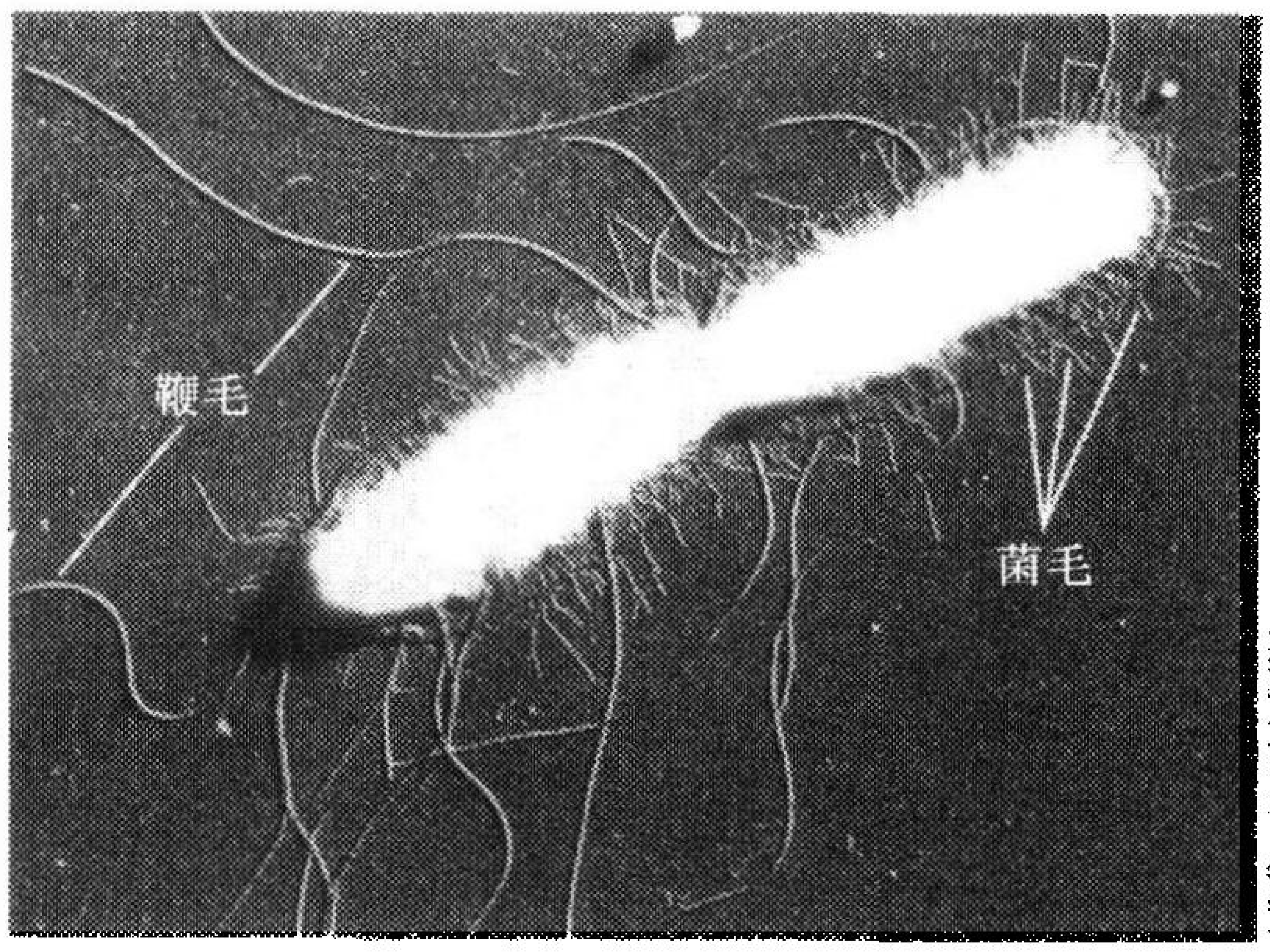


图 4.37 菌毛。鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhi*）细胞分裂的电镜照片，显示鞭毛和菌毛，单个细胞直径约 0.9μm。

性毛与菌毛结构相似，但一般较长一些，而且表面只有一根或几根性毛。因为性毛可以作为某些类型病毒的吸附位点，所以当与病毒颗粒结合时可在电子显微镜下观察到（图 4.38）。虽然性毛可能像菌毛一样起到黏附作用，但它主要参与原核生物的接合过程（遗传交换的一种形式），这将在 10.9 节中讨论。

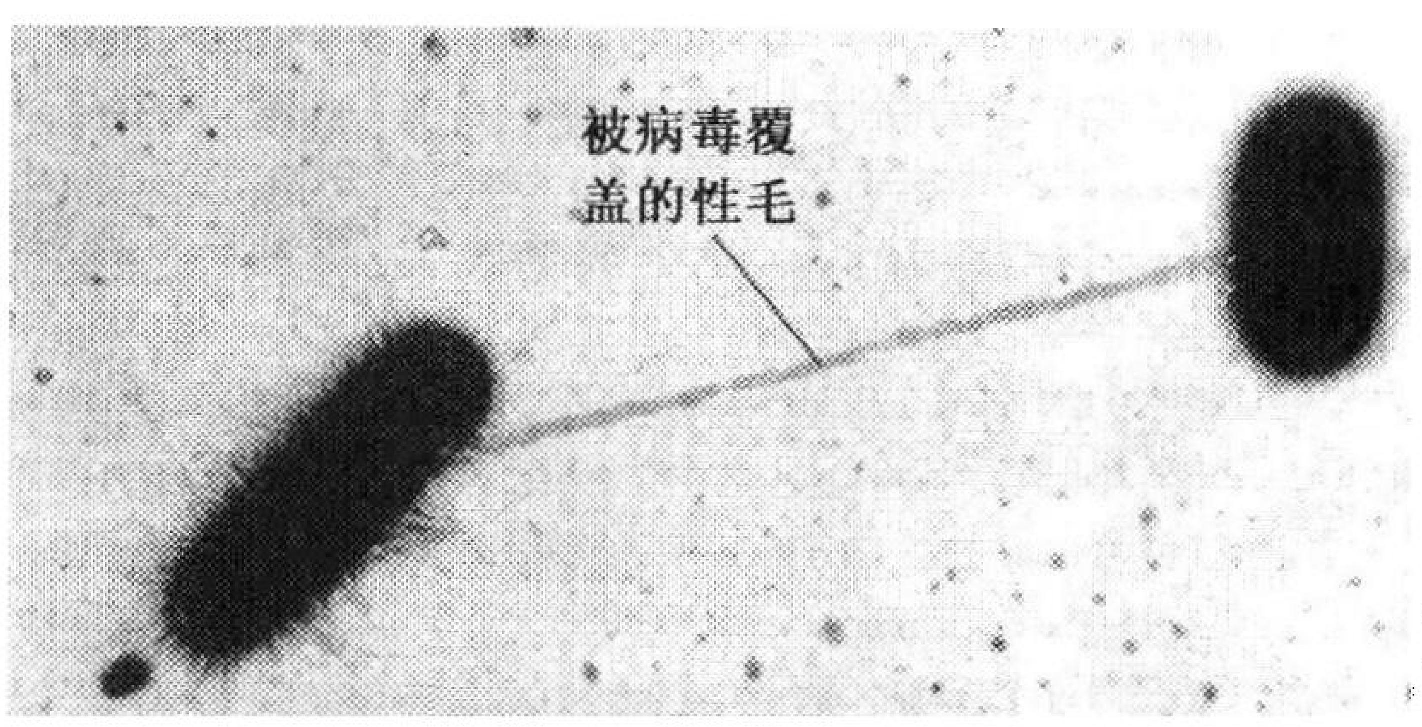


图 4.38 性毛。大肠杆菌上存在的性毛可以利用病毒显示出来，病毒可特异性地吸附性毛，细胞直径约 0.8μm。

根据结构与功能的不同，可以将菌毛/性毛分为许多种类。一种类型称为Ⅳ型菌毛/性毛（typeⅣ fimbriae/pili），参与某些细菌的一种特殊运动方式——颤动（twitching motility）。颤动是细菌在固体表面运动的一种方式，它通过菌毛快速和可逆地伸展和收缩使细胞沿着表面爬行。与其他类型菌毛不同的是，Ⅳ型菌毛仅存在于菌体两端，而且除了运动作用外，有证据表明它可以作为一些病原菌［如霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）

（霍乱）和脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）（细菌性脑膜炎）] 的宿主定居因子。Ⅳ型菌毛还被认为可以通过广泛的各种细菌的转化过程介导遗传转移（见 10.7 节）。

类结晶表面层

许多原核生物含有由蛋白质平面排列构成的细胞表面层，这些层叫 S 层（S-layer）。已发现 S 层存在于每种系统发育种群的代表菌中，且普遍存在于古生菌中。在古生菌的某些种中 S 层就是细胞壁（见 4.8 节）。S 层具有类似于晶体的外貌，并且根据组成它们的蛋白质或糖蛋白亚单位的数量与结构的不同，显示出各种对称性，如六边形、四边形、三边形（图 4.33b，S 层的电子显微照片）。

S 层的主要功能还未知，但是，作为细胞与环境之间的界面，S 层可能起到选择性分子筛的作用，可以允许低分子质量物质通过，而排除大分子物质（如病毒颗粒）。S 层具有滞留细胞附近蛋白质的功能，这点非常类似于革兰氏阴性菌外膜的作用。还有证据表明致病性细菌含有 S 层，该结构可以保护细菌抵御寄主的防卫系统。

荚膜和黏液层

许多原核生物在它们的体表分泌出黏状的或胶质状的物质（图 4.39），大多数这些结构由多糖组成，少数由蛋白质组成。荚膜和黏液层这两个术语常用来描绘这些多糖层，不同的生物体这些层的组成也不同，可以是厚的也可以是薄的，可以是坚硬的也可以是柔软的，根据它们的化学性质而定。坚硬层排列成致密的矩阵形式，排斥像印度墨汁这样的小颗粒，这种形式称为荚膜（capsule）（图 4.39a），如果这层很易变形，不排

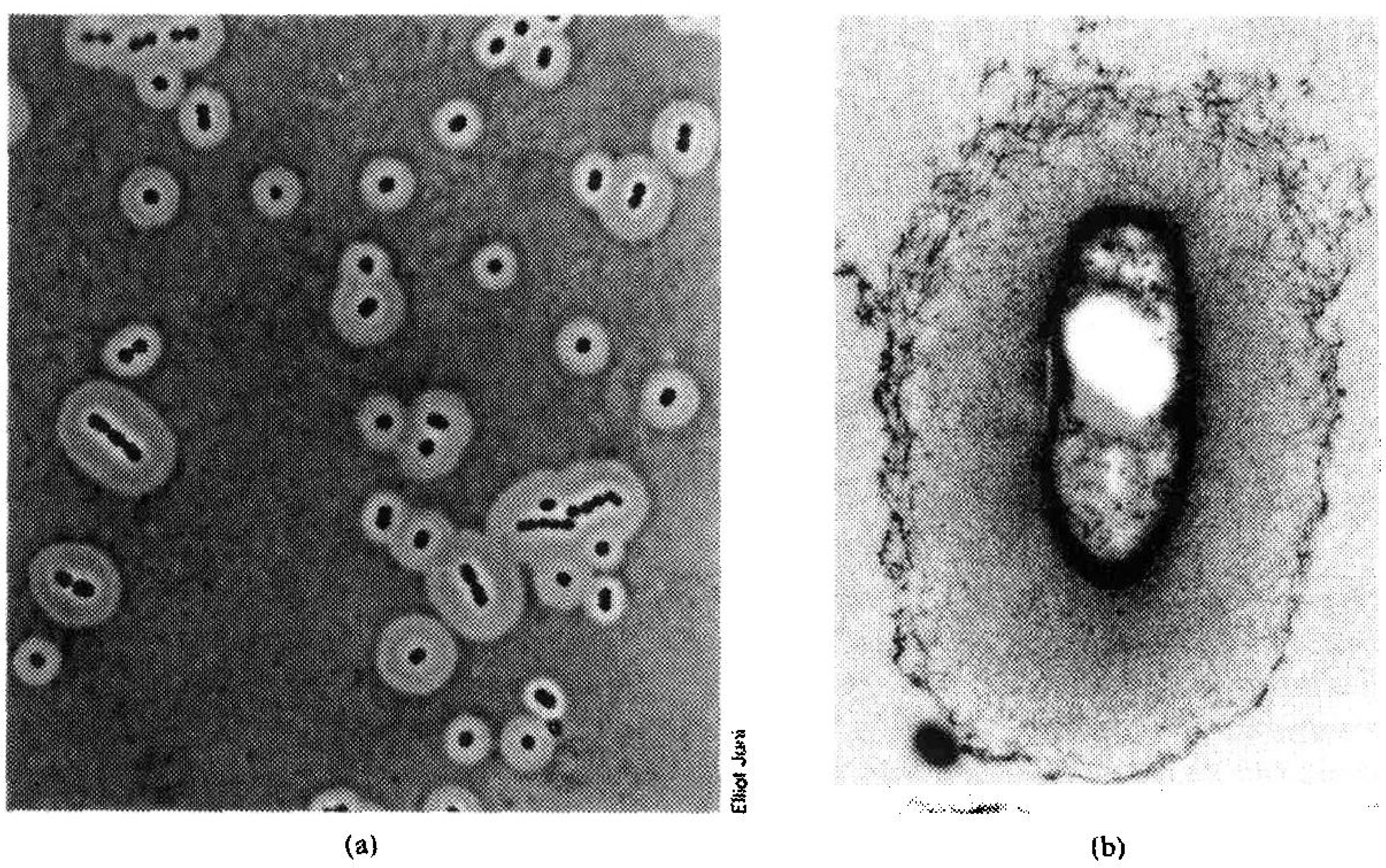


图 4.39 细菌荚膜。（a）用印度墨汁负染和相差显微镜观察到的不动杆菌（*Acinetobacter*）的荚膜，印度墨汁不能穿透荚膜，因此在暗背景下显示亮的外部结构。（b）钌红染色的三叶草根瘤菌（*Rhizobium trifolii*）显示荚膜的电镜照片，细胞的直径（不包括荚膜）约为 0.7μm。尽管多数荚膜由多糖组成，但有些细菌含有蛋白质荚膜。例如，与动物疾病和生物恐怖（见 25.12 节和 25.13 节）有关的炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）的细胞含有聚-D-谷氨酸荚膜，可有效防止宿主防御系统对细胞的破坏。

斥某些颗粒，而且较难看见，这种排列形式称为黏液层（slime layer）。

多糖层在细菌中有许多功能。表面多糖有助于微生物吸附在固体表面。我们将看到（见 21.6 节），致病性微生物以特殊路径进入动物体内，它们通常首先与宿主组织的表面组分发生特异性结合，这种结合是由细菌细胞表面多糖介导的。许多非病原细菌也自然地结合到固体表面，有时形成一厚层细胞，称为生物膜（biofilm），多糖在生物膜的形成中起关键作用（见 19.3 节）。

黏液层还有其他的作用，如有荚膜的病原菌很难被免疫系统的吞噬细胞识别并破坏（见 22.2 节）。此外，因为外部多糖层结合有大量的水，这可能使多糖层在抵御干燥中发挥着一些作用。

概念检查

原核生物细胞通常含有各种表面结构，包括菌毛、性毛、S 层、荚膜和黏液层。这些结构具有多种功能，但一个主要功能是吸附细胞到固体表面。

- 菌毛和性毛在结构和功能上有何不同？
- 尽管 S 层缺少脂类，但是它如何起到类似于外膜的作用？

4.11 细胞内含物

细胞内常能见到颗粒体或其他内含物。在不同生物中它们的性质是不同的，但它们普遍起着能量储藏和结构建造材料库的功能。用光学显微镜可直接观察到内含物（图 4.41）。大多数细胞内含物由一层薄的非单位膜包围，这层膜由脂类组成，将内含物与细胞质分开。

碳储藏多聚体

原核生物中，最常见的内含物之一是由聚 β-羟基丁酸（poly-β-hydroxybutyrate，PHB）组成，它是一种由 β-羟基丁酸单位组成的类似于脂类的复合物（图 4.40a）。这个酸的单体以酯键连接形成一条长的 PHB 多聚体，这些多聚体聚集起来形成颗粒（图 4.40b），多聚体中单体的长度变化很大，在某些生物中，短的有 C_4，长的达到 C_{18}。因此，更通用术语聚 β-羟基链烷酸（poly-β-hydroxyalkanoate，PHA）用来描述整个这一类碳或能量储藏复合体。当碳源过剩时合成 PHA，当为生物合成提供碳骨架或者当条件允许时生成 ATP 时，则 PHA 被分解。很多种原核生物（包括细菌和古生菌的代表株），都生成 PHA。

原核生物形成的另一种储藏产物是糖原（glycogen），它是一个葡萄糖多聚体（见 3.3 节和图 3.6）。与 PHA 一样，糖原也是碳源和能源的储藏库。当环境中碳源过剩时糖原生成，碳源不足时则被消耗。糖原类似于植物的主要储藏库淀粉，但与其不同的是葡萄糖单位连接在一起的方式（图 3.6b）。

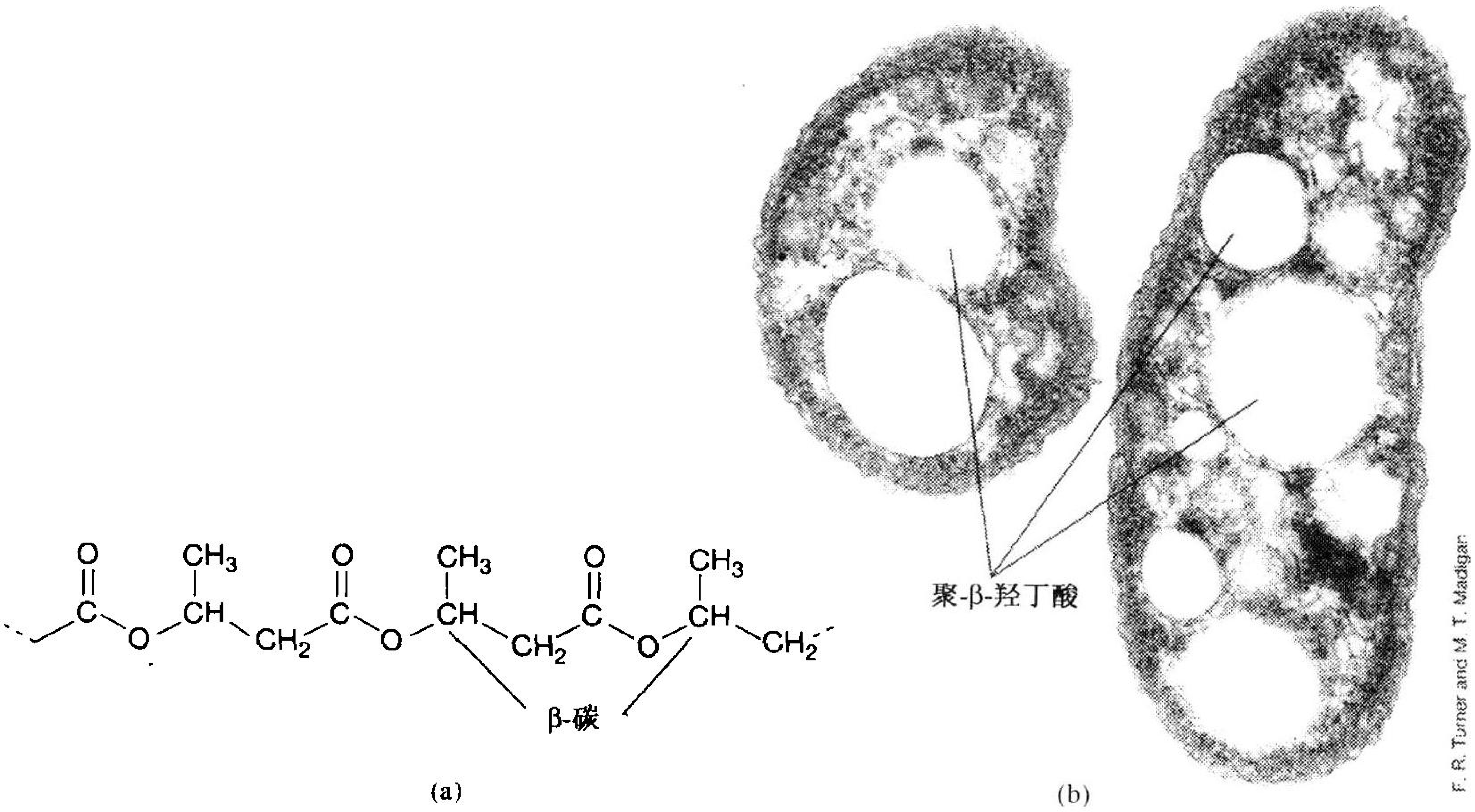


图 4.40 聚 β-羟基丁酸（PHB）。（a）PHB 的化学结构，一个普通的聚 β-羟基链烷酸。（b）含有 PHB 颗粒的光养细菌索德门玫瑰弧菌（*Rhodovibrio sodomensis*）（图 4.10b）的电镜照片。

其他储藏物和内含物

许多微生物以聚磷酸盐（polyphosphate）颗粒的形式积累无机磷酸盐，这些颗粒可以被降解作为合成核酸和磷脂的原料。另外，许多原核生物能够氧化还原硫的复合物，如硫化氢（H_2S），这些氧化反应可能与能量代谢反应有关（见 17.8 节和 17.10 节）或与生物化学合成有关（见 17.6 节）。无论哪种情况，硫元素（elemental sulfur）以容易可见的颗粒形式积累在细胞内（图 4.41）。这些元素硫的颗粒一直保持作为还原型硫的

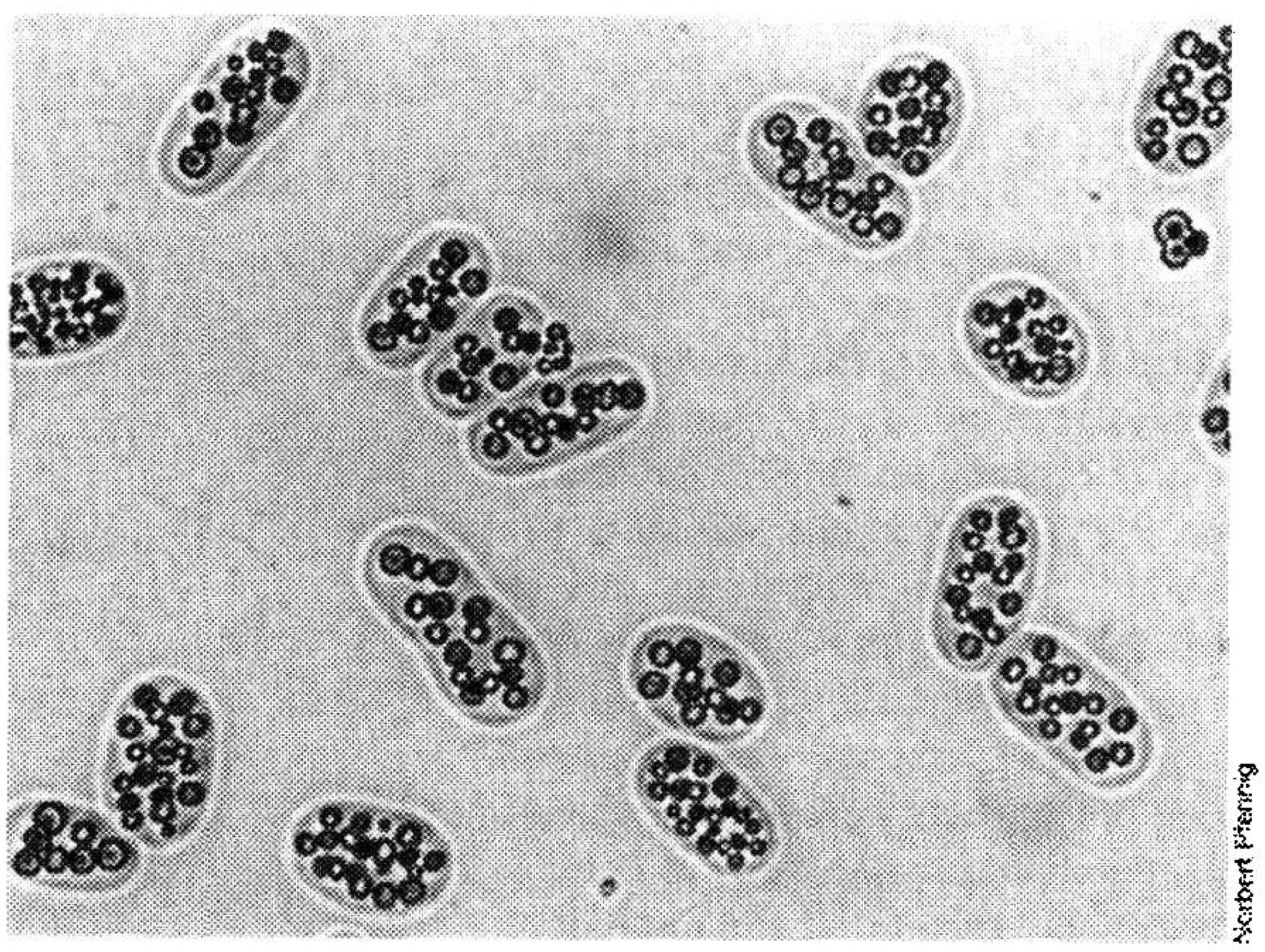
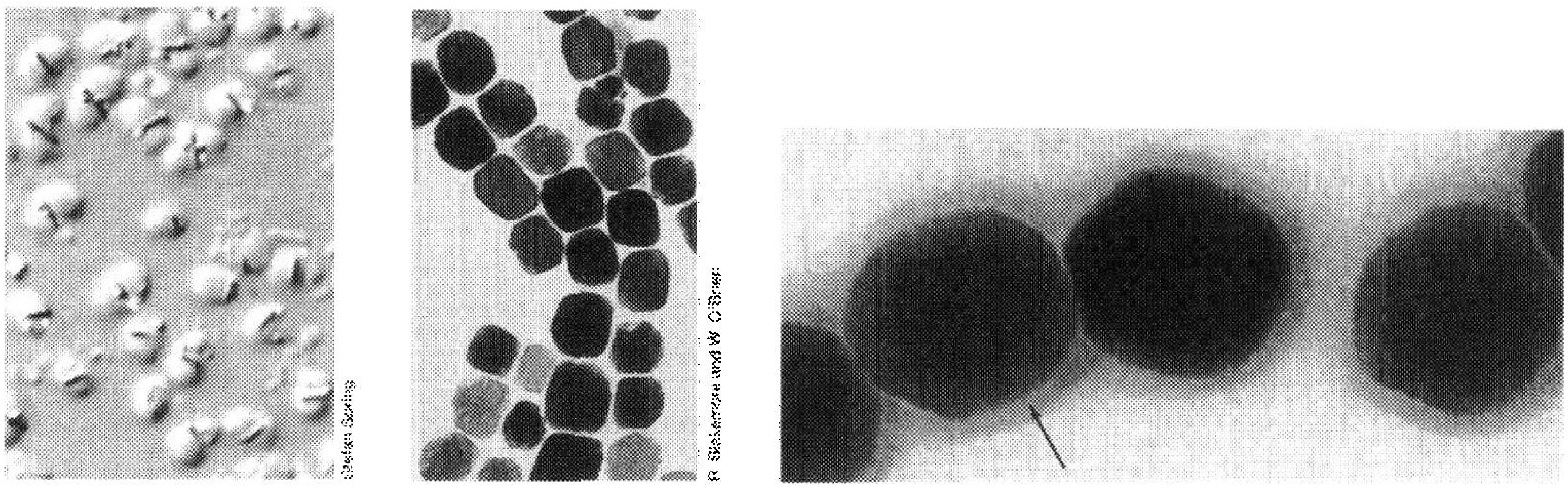


图 4.41 硫小体。紫色硫细菌（*Isochromatium buderi*）亮视野显微照片。注意细胞中的硫小体，硫化氢氧化获得的。单个细胞大小约为 4μm×7μm。

来源。只有当还原型硫来源变得有限时，颗粒中的硫才被氧化成硫酸盐（SO_4^{2-}），同时这些颗粒则随着反应的进行而慢慢消失。

有趣的是，硫小体本身实际存在于周质中，而不是细胞质中（硫氧化光养或化能无机营养型原核生物是革兰氏阴性菌）。周质向外展平调节硫小体 H_2S 被氧化（$H_2S \rightarrow S^0$），然后周质向内收缩 S 被氧化（$S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$）。可能一些其他“胞浆内的”内含物也在革兰氏阴性菌的周质内，到目前为止，至少聚 β-羟基链烷酸（图 4.40）属于这个范畴。

磁小体（magnetosome）是细胞内磁铁矿 Fe_3O_4 颗粒（图 4.42）。磁小体赋予细胞两极磁性，使其对磁场有反应，含有磁小体的细菌（图 4.42a）表现出趋磁性（magnetotaxis），即沿着地球磁场转向和迁移的过程（见 12.14 节）。虽然趋磁性这个词有“趋性”这个后缀，但还没有论据证明趋磁细菌使用趋化性或趋光性那样的感觉系统（见 4.16 节和 8.12 节）。实际上，细胞内的磁小体排成直线，使之具有磁性从而使细胞在环境中确定方向。



(a)　(b)　(c)

图 4.42　趋磁细菌和磁小体。(a) 球形趋磁细菌的微分干扰显微照片。注意磁小体。单个细胞直径约 2.2μm。(b) 从趋磁细菌——向磁磁螺菌（*Magnetospirillum magnetotacticum*）分离的磁小体，每个颗粒约 50nm 长（图 12.32）。(c) 磁小球中的磁小体透射电子显微照片。箭头所指是膜包围每个磁小体。单个磁小体宽为 90nm，尽管含有脂质和蛋白质，但磁小体的膜类似于 PHB 膜（图 4.40）是一单层膜，而不是真正“单位”膜。

磁小体的主要功能还是未知的，但已经在不同的水生细菌中发现了磁小体（图 4.42a），它们在低 O_2 浓度下生长很好，因此，推测磁小体的功能是引导这些水生细菌向沉积物（因为主要的磁场线指向下方）移动，那里 O_2 水平较低。

磁小体由一层含有磷脂、蛋白质和糖蛋白的膜包围（图 4.42b、c）。这层膜不像细胞质膜那样是单位膜（图 4.16），而是像包围聚 β-羟基链烷酸微粒的膜一样，是非单位膜（PHB，图 4.40）。磁小体膜蛋白可能在沉淀 Fe^{3+} 为磁小体中的 Fe_3O_4 中起作用（Fe^{3+} 经螯合剂以可溶性方式带入细胞）。磁小体的形态学具有种属特异性，不同种类的细菌有正方形、长方形，还有刺状等多种形状，并在细胞内形成链（图 4.42）。

概念检查

原核细胞通常含有内粒，如硫粒、聚磷酸盐、PHA 和磁小体。这些物质的功能在于储存原料或趋磁性。

◆ 你认为在什么生长条件下会生成 PHA 或糖原？

◆ 为什么革兰氏阳性菌不能像化能无机营养型的硫氧化菌一样积累硫？

◆ 哪种形式的铁存在于磁小体中？

4.12 气泡

许多原核生物是浮游生物，存在于湖泊或海洋的水中漂浮生活。许多浮游原核生物产生气泡（gas vesicle），这些结构通过减少细胞密度使细胞具有浮力。气泡是运动的一种手段，使细胞根据环境因素而在水中上升或下降。

靠气泡漂浮的最明显的例子是蓝细菌，它们在湖泊内形成很大的聚集群（水华，bloom）（图 4.43）。含有气泡的细胞上升到湖泊表面，在风吹动下聚成紧密的块状物。气泡也存在于某些紫色和绿色光养细菌（见 12.2 节）和某些非光养细菌中，它们生活在湖泊或池塘中。古生菌中的某些种也含有气泡。

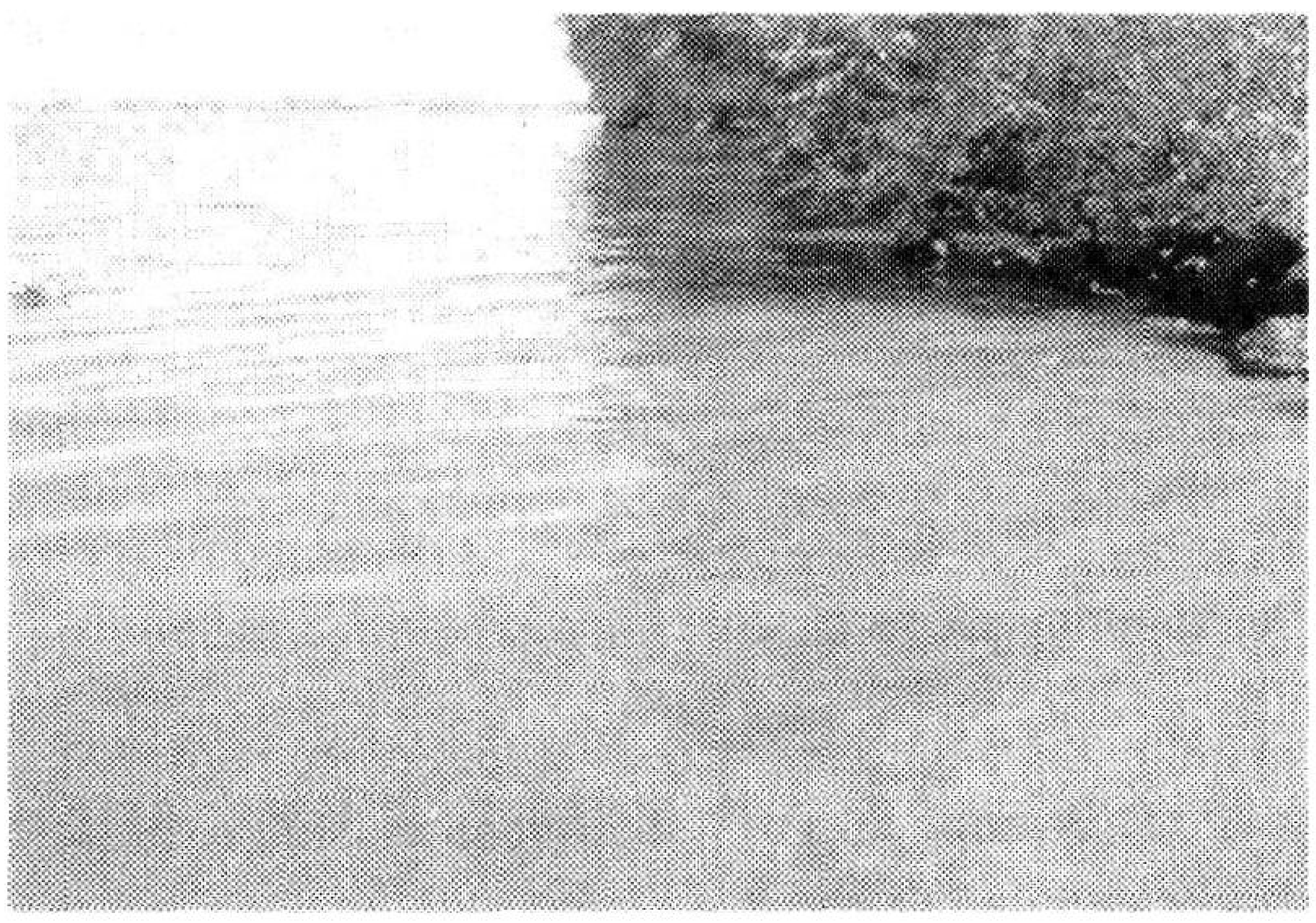


图 4.43 自然界中的气泡。位于威斯康星洲麦迪逊的梦多塔湖，由于富含营养，湖中飘浮着大量由具有气泡的蓝细菌形成的水华。

气泡的结构

气泡是由蛋白质构成的纺锤形、富含气体的结构，中空且有硬度，长度与直径变化多样（图 4.44）。不同生物中的气泡长度为 300～1000nm 或以上，宽度为 45～120nm，但任何一种生物的气泡大小是基本一致的。

每个细胞含有的气泡数从几个到几百个不等。气泡膜只由蛋白质组成，大约 2nm 厚，不透水和溶质，但对大多数气体来说是可透的。细胞中气泡的存在可通过光学显微镜（称为气泡的泡囊簇，显示不规则的透亮内含物）或电子显微镜来观察（图 4.45）。

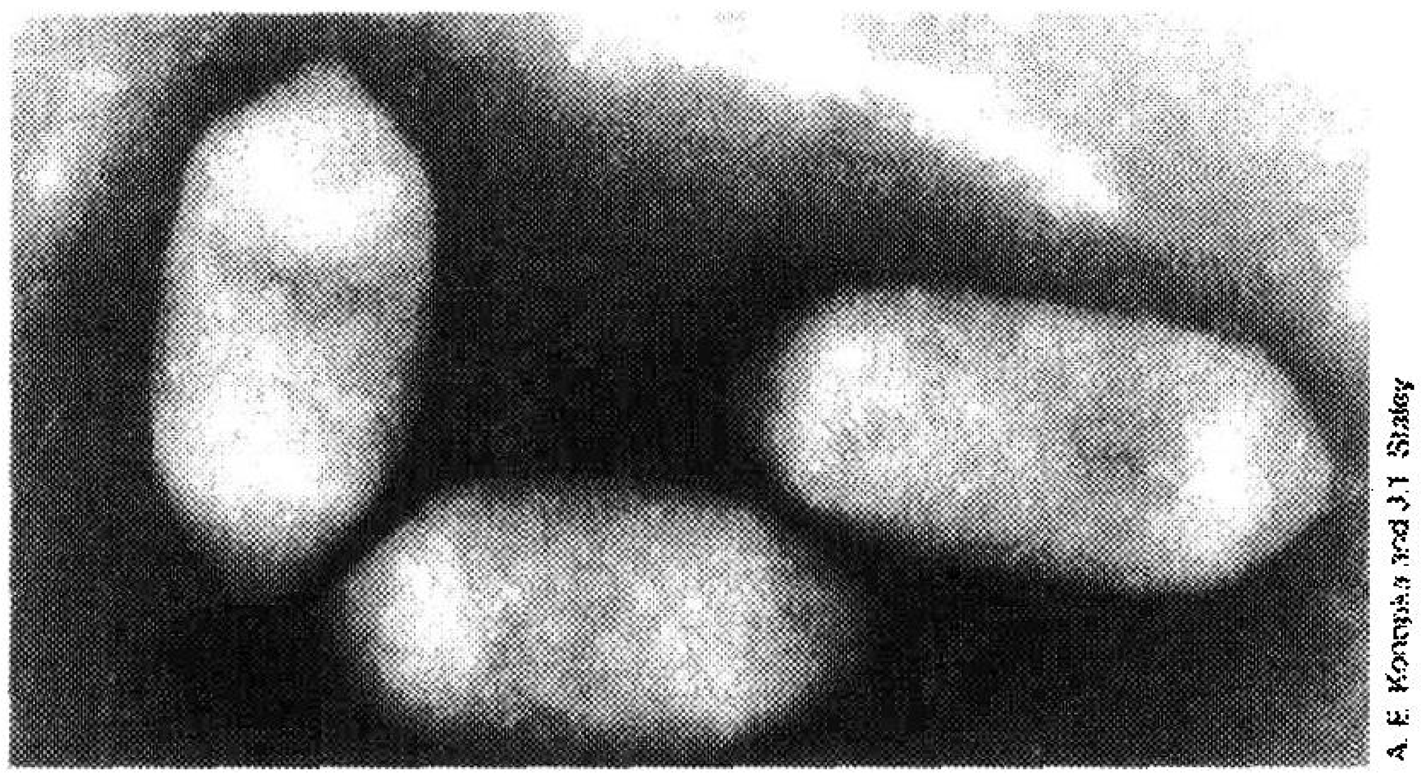
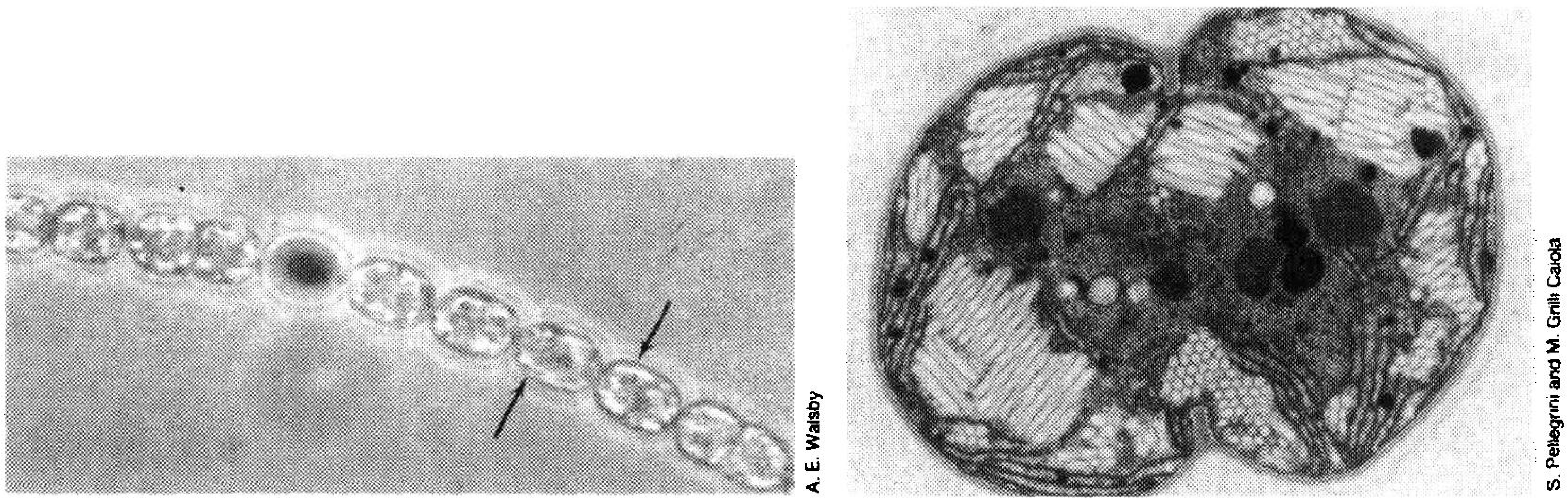


图 4.44　分离的气泡。从水生弯杆菌（*Ancylobacter aquaticus*）中纯化的气泡的透射电镜照片，用负染法染色观察，单个气泡的直径约 100nm。[经允许复制于 *Archives of Microbiology* 112：133～140（1997）]



(a)　(b)

图 4.45　鱼腥蓝细菌属（*Anabaena*）和微囊蓝细菌属（*Microcystis*）的气泡。（a）水华鱼腥蓝细菌（*Anabaena flos-aquae*），中央的黑细胞（一个异形胞）缺少气泡。在其他细胞中，泡囊群在一起形成亮的气泡（箭头）。（b）微囊蓝细菌透射电镜照片，气泡排列成束，在这里可以看到纵切面和横切面的气泡。

气泡的分子结构

气泡由两种不同的蛋白质组成（图 4.46）。主要的一种气泡蛋白称为 GvpA，它是一种小的、高度疏水的、非常坚硬的蛋白质。气泡膜的硬度对抵抗外部施加于这个结构的压力是很重要的。GvpA 构成了气泡的外壳并且占气泡总蛋白的 97%。另一种次要蛋白质称为 GvpC，具有增强气泡外壳的作用（图 4.46）。

气泡是由 GvpA 蛋白的许多拷贝构成的，这些蛋白质相连成平行的嵴，从而形成不透水的壳，GvpA 嵴由 GvpC 蛋白得以巩固，GvpC 蛋白以一定角度交联 GvpA，将几条 GvpA 分子连接在一起，像一个夹板（图 4.46）。气泡的最终形状从细、长到短、粗（比较图 4.44 和图 4.45b），在不同生物中不同。

因为气泡膜允许气体自由透过，所以气泡内的气体组分和压力与悬浮生物的气体是一样的，并且因为气泡的密度仅为细胞的 5%～20%，所以气泡的存在降低了细胞的密度，从而增加了浮力。这种运动策略特别是对水生光养生物很有利，因为它使生物体垂直调整在水中的位置，找到最适于光合作用的光照强度。

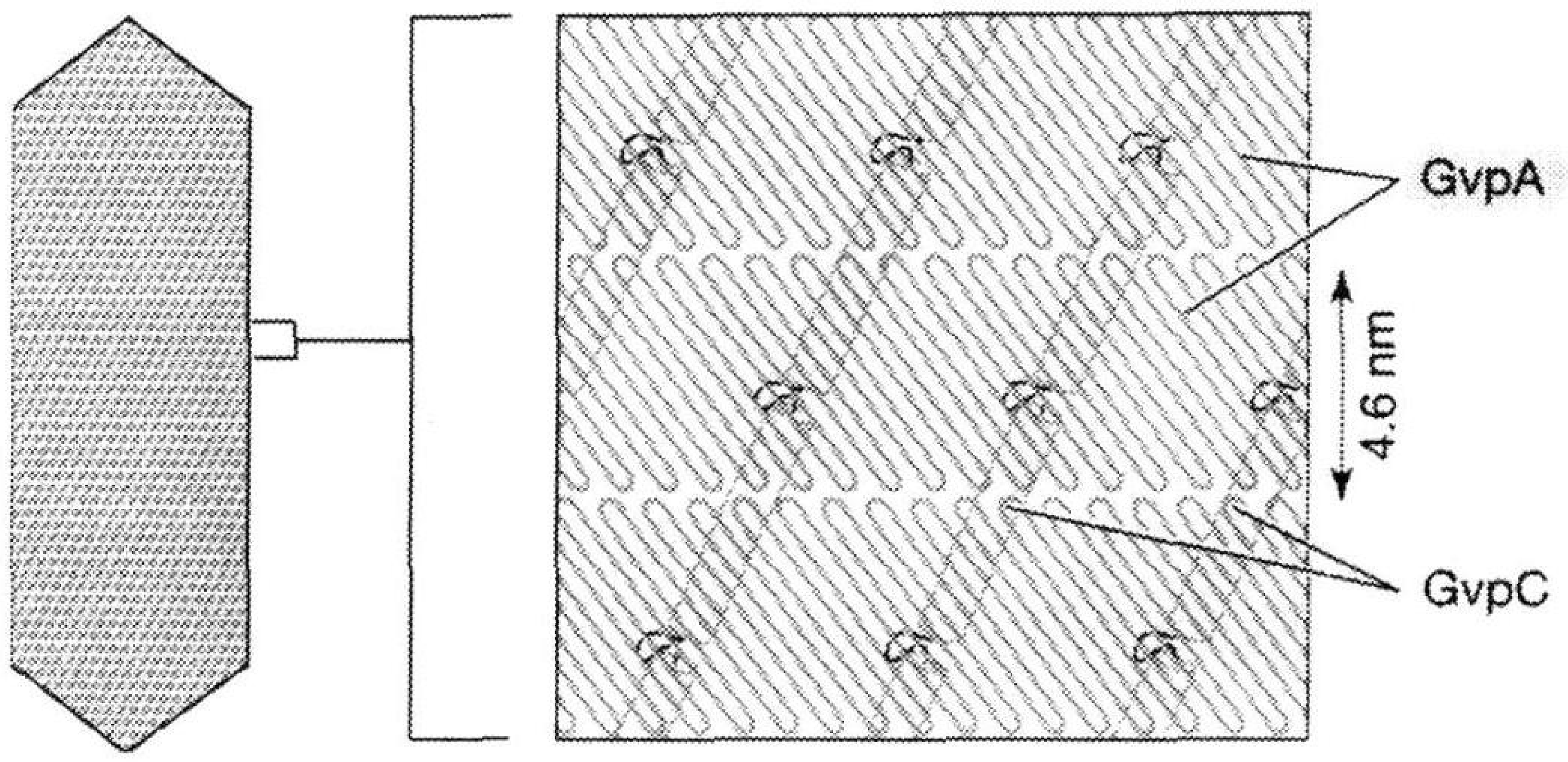


图 4.46 气泡蛋白。两种蛋白质如何构成气泡的模型，GvpA 和 GvpC 蛋白相互作用形成一个不透水的但透气的结构。GvpA 构成肋状凸起，是一个坚硬的 β 折叠结构，GvpC 形成交联的 α 螺旋结构（见 3.7 节和图 3.16）。

概念检查

气泡是由蛋白质构成的小的充满气体的结构，其功能是赋予细胞浮力。气泡包括两种不同的蛋白质，它们排列形成一个可透过气体但不透水的结构。

◆ 气泡对于光能营养细胞的益处是什么？（提示：光能营养生物的生长需要什么？）

◆ 构成气泡的两种蛋白质 GvpA 和 GvpC 是如何排列形成这个不透水的结构的？

4.13 内生孢子

某些细菌在芽孢形成（sporulation）（图 4.50）过程中产生的结构称为内生孢子（endospore，也可称为芽孢）（图 4.47）。内生孢子（前缀“endo”的意思是“内部”）是分化了的细胞，具有高度抗热且很难被化学物质或辐射破坏的特性。内生孢子的生物学功能无疑可使生物体渡过困难时期，包括极端温度、干旱和营养物质匮乏的时期。内生孢子也是通过风、水或经过动物消化道散布的理想结构。产生内生孢子的细菌广泛存在于土壤中，芽孢杆菌属（*Bacillus*）和梭菌属（*Clostridium*）是研究最好的产内生孢子的细菌。

细菌内生孢子的发现对微生物学是非常重要的，因为了解这些异常抗热结构对发展适宜的灭菌方法，不仅对培养基，而且对食品及其他易于腐败的物品的灭菌都是十分必要的。虽然许多微生物可以形成孢子，但是细菌的内生孢子在抗热程度上是突出的，即使高压灭菌在 121℃下可以杀死有内生孢子的大多数种，但高抗热的细菌内生孢子可在高达 150℃时生存。内生孢子也可抵抗其他有害的因子，如干旱、紫外辐射、强酸或强碱及化学消毒剂，它可保持一段相当长的休眠期（见知识窗，内生孢子可以存活多久？）。

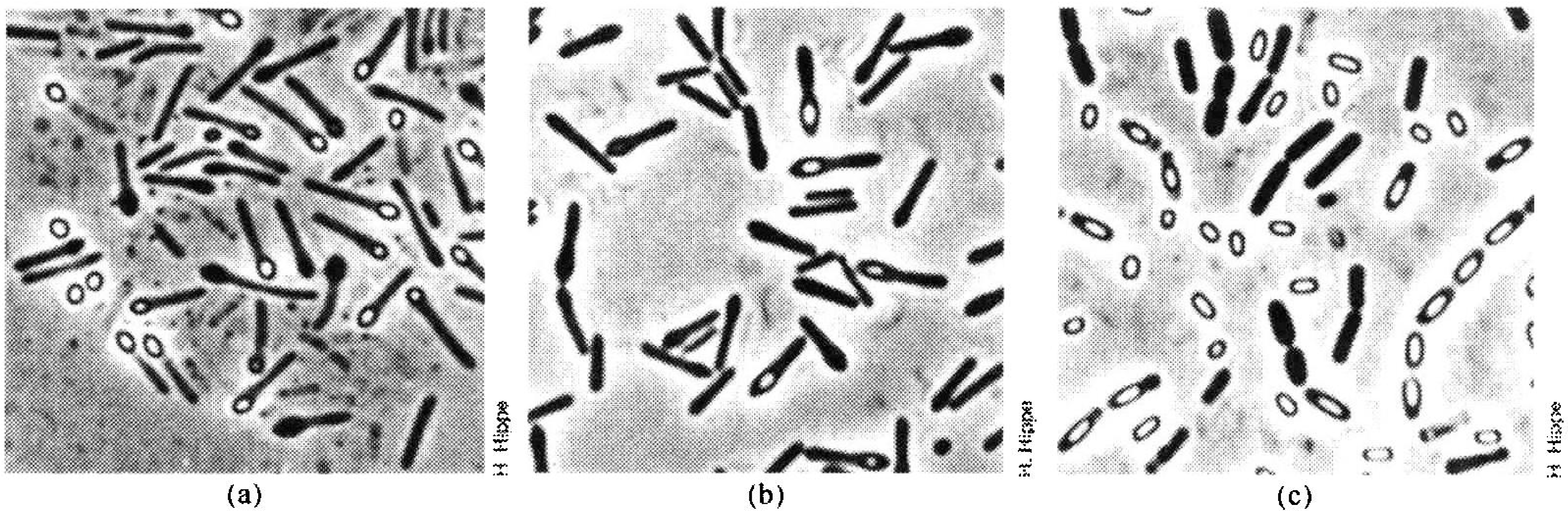


图 4.47　细菌的内生孢子。几种内生孢子类型的形态学和胞内位置的相差显微照片。(a) 端生孢子。(b) 近端生孢子。(c) 中央孢子。

内生孢子的结构

内生孢子作为强折光结构，在光学显微镜下很醒目（图 4.47）。内生孢子对多数染料不渗透，所以在用碱性染料（如甲基蓝）染色的细胞内，它们常被看作是没有染色的区域，为了使内生孢子着色，必须使用特殊的染色方法。

在电子显微镜下看到的内生孢子结构与营养细胞结构很不同（图 4.48），特别是它在结构上比营养细胞更复杂，具有许多层，这在营养细胞中是没有的。最外层称为孢外壁（exosporium），由一薄层蛋白质覆盖。它里面是芽孢衣（spore coat），由多层芽孢特异蛋白组成（图 4.48b）。芽孢衣下面是皮层（cortex），由松弛的交联肽聚糖构成。

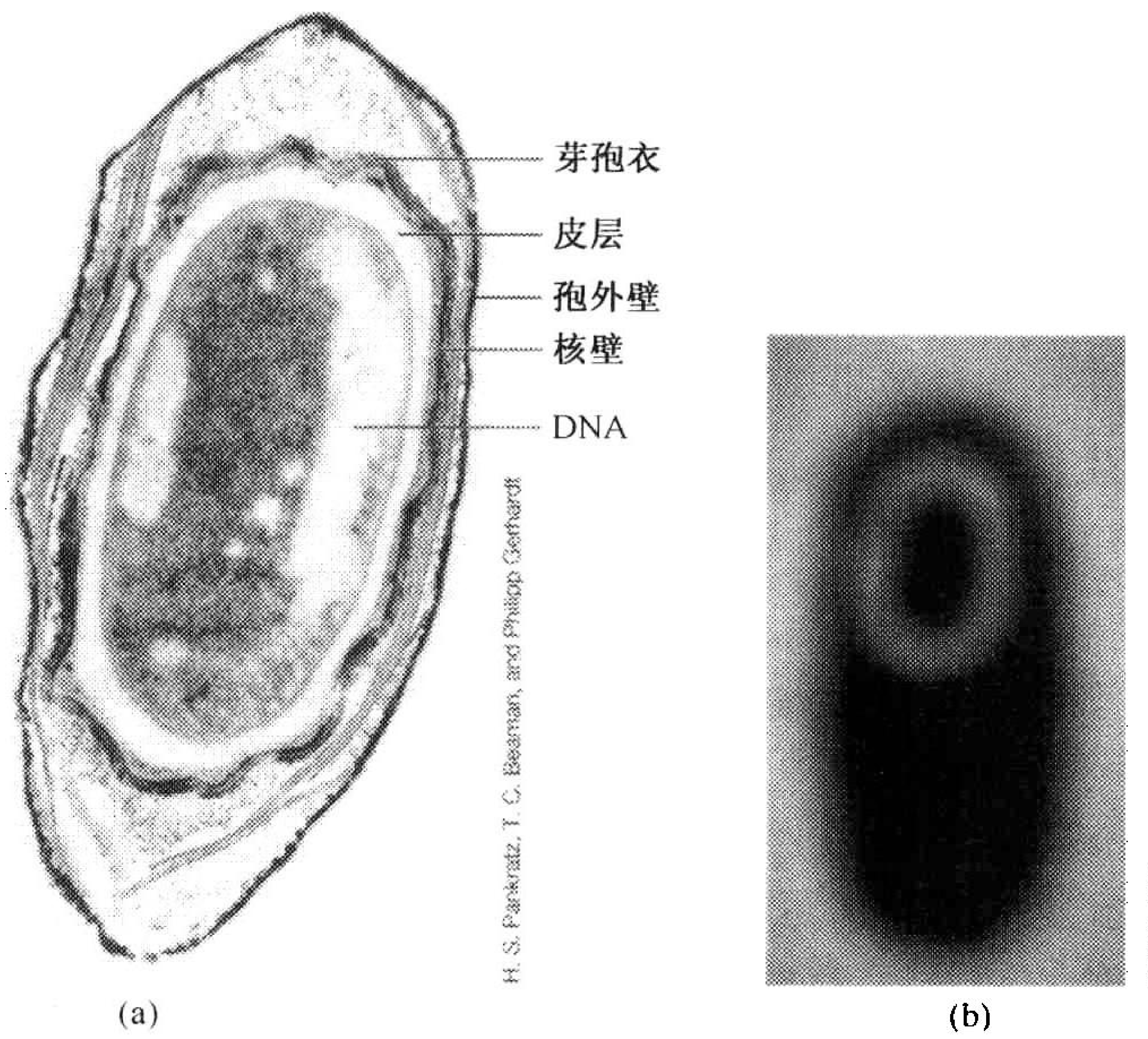


图 4.48　解剖细菌的内生孢子。(a) 巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）成熟内生孢子的透射电子显微照片。(b) 枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）芽孢形成时荧光显微照片，绿色区域是由于染料特异性地使芽孢外衣中芽孢蛋白着色。

皮层内面是核心（core）或芽孢原生质体（spore protoplast），它含有核壁、细胞质膜、细胞质、拟核、核糖体和其他细胞必需物质（见 2.1 节和图 2.1a）。因此，内生孢子在结构上不同于营养细胞之处主要在于核壁之外的那些层次结构。

有一种为内生孢子所特有，而营养细胞所没有的化学物质称为吡啶二羧酸（dipicolinc acid）（图 4.49），所有内生孢子都发现有这种物质，并且位于内生孢子的核心。内生孢子富含钙离子，大多数的钙离子与吡啶二羧酸结合。核中钙-吡啶二羧酸复合物约占内生孢子干重的 10%。复合物的作用是降低内生孢子中水的利用率，使它脱水变干。总之，复合物插入（碱基之间插入）DNA，这样使它具有热稳定性。

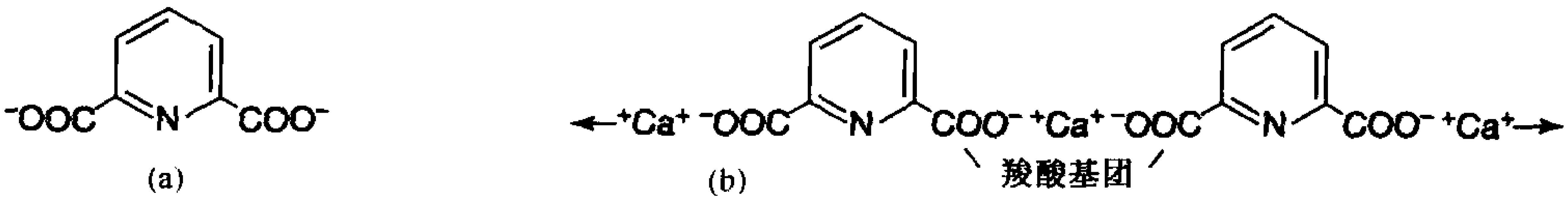


图 4.49 吡啶二羧酸（DPA）。(a) DPA 的结构。(b) Ca^{2+} 交联两个 DPA 分子形成一个复合物。

内生孢子核心的特性

成熟内生孢子的核心与形成它的营养细胞有很大不同。除了高含量的钙-吡啶二羧酸（图 4.49）能降低核心含水量外，芽孢形成过程中，核心变得进一步脱水。成熟内生孢子的核心只含营养细胞水分的 10%～25%，因此核心细胞质稠度是凝胶状。核心脱水大大增加了内生孢子的抗热性，而且已经显示脱水赋予了内生孢子对化学物质［如过氧化氢（H_2O_2）］的抗性，同时引起核心中的酶失活。

除了内生孢子的低水含量外，核心 pH 也比营养细胞的细胞质低大约 1 个单位，而且核心含较高量称为小酸溶性芽孢蛋白（small acid-soluble protein，SASP）的蛋白质。它们在孢子形成过程中产生，至少有两种功能，SASP 与核心 DNA 紧密结合，保护其免受紫外辐射、脱水及干热的损害。当 SASP 改变 DNA 的分子结构从正常的“B”型变为紧密的“A”型时，赋予了紫外抗性，A 型 DNA 对一种突变方法（即紫外辐射）形成嘧啶二聚体和干热变性效果更具抗性（见 10.4 节）。此外，SASP 还可作为内生芽孢形成新营养细胞生长的碳源和能源，这个过程称为萌发（本节后面讨论）。

内生孢子的形成

在内生孢子形成期间，营养细胞转变成一种不再生长的、抗热的结构（图 4.50）。正像以前描述的和表 4.3 总结的那样，内生孢子与营养细胞之间的区别是很大的。芽孢形成涉及细胞分化很复杂的一系列过程。细菌芽孢形成不出现在细胞正在分裂的对数期，而只出现在由于必需养料耗尽的细胞生长停止期。芽孢杆菌细胞是一种典型的形成芽孢的细菌，当一种关键养料（如碳源或氮源）有限时，营养细胞生长停止，开始形成芽孢。

在由营养生长向芽孢形成的转变中，细胞中发生了许多遗传学上的定向改变，图 4.51 显示了芽孢杆菌细胞在芽孢形成中出现的结构变化，芽孢形成过程可分成几个阶段。对枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）芽孢形成进行了较为详细的研究，整个芽孢形

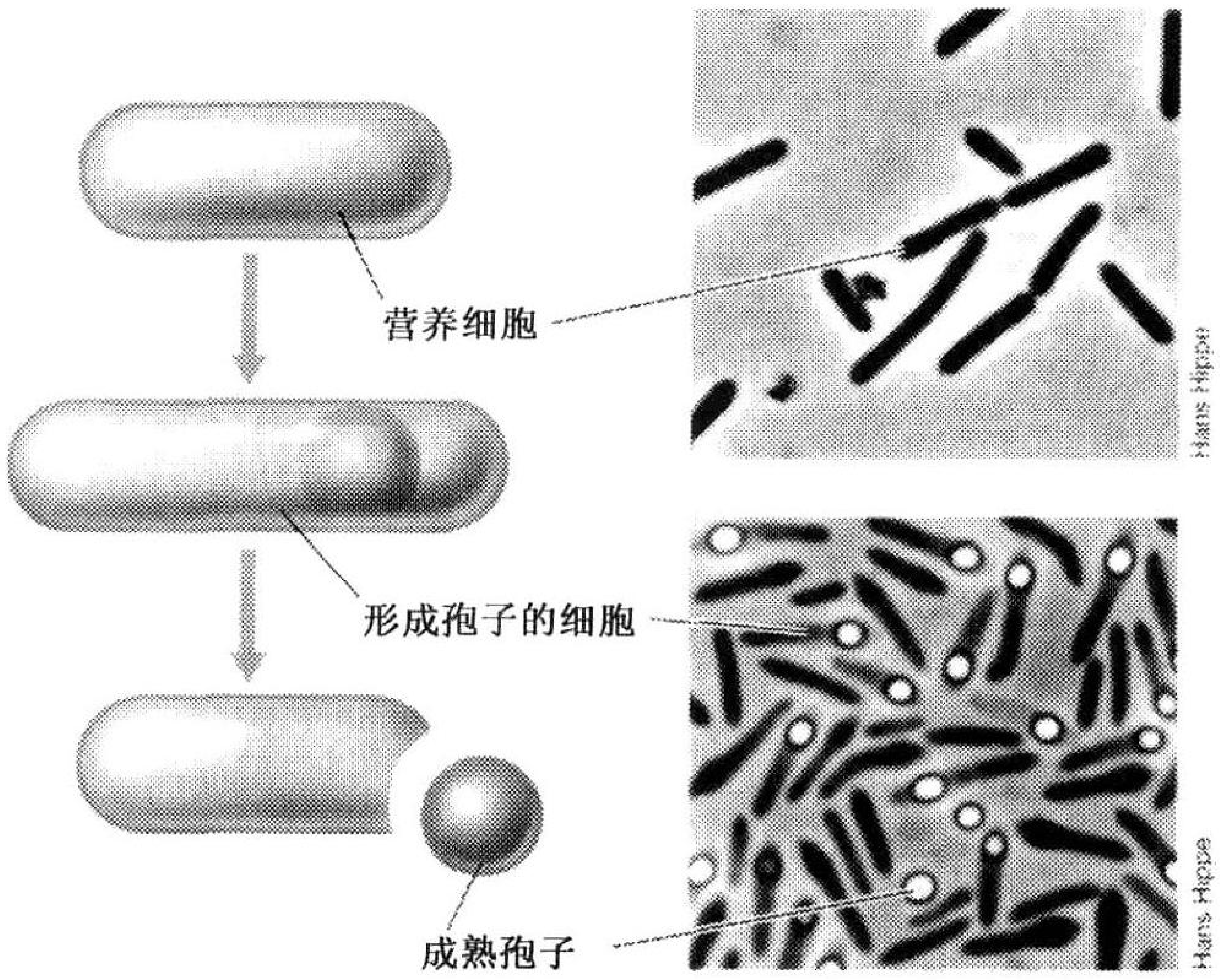


图 4.50　芽孢形成。牧场梭菌（*Clostridium pascui*）细胞的相差显微照片。

成过程经历 8 个小时。图 4.51 显示了在芽孢形成的某一阶段进行阻断，形成许多枯草杆菌的突变株，对它们的基因研究表明有 200 多个基因与芽孢形成过程有关。芽孢形成需要合成许多蛋白质（图 4.48b），这些蛋白质与营养细胞功能停止有关，另外，还需生成一些特异的芽孢蛋白，这要通过激活一些芽孢特异的基因来完成，包括 *spo*、*ssp* 基因（编码 SASP），还有一些对环境触发有反应的基因可形成芽孢。由这些基因编码的蛋白质催化一系列反应，使之从湿润的代谢营养细胞转向相对干燥的代谢不活泼而有极端抗性的内生孢子（表 4.3 和图 4.51）。

表 4.3　内生孢子与营养细胞的区别

特征	营养细胞	内生孢子
结构	大部分革兰氏阳性细胞 少数革兰氏阴性细胞	厚的芽孢皮层、芽孢衣、孢外壁
显微镜外观	无折光性	折光性
钙	低	高
吡啶二羧酸	无	有
酶促活性	高	低
代谢（O_2摄取）	高	低或无
大分子合成	有	无
mRNA	有	少或无
抗热性	低	高
抗辐射性	低	高
抗化学物质（如 H_2O_2）或酸类	低	高
对染料可染性	可染	需要用特殊方法可染
溶菌酶作用	敏感	抗性
水含量	高，80%～90%	低，核内 10%～25%
小酸溶性蛋白（*ssp* 基因产物）	无	有
细胞质 pH	约 pH7	pH5.5～6.0（核心）

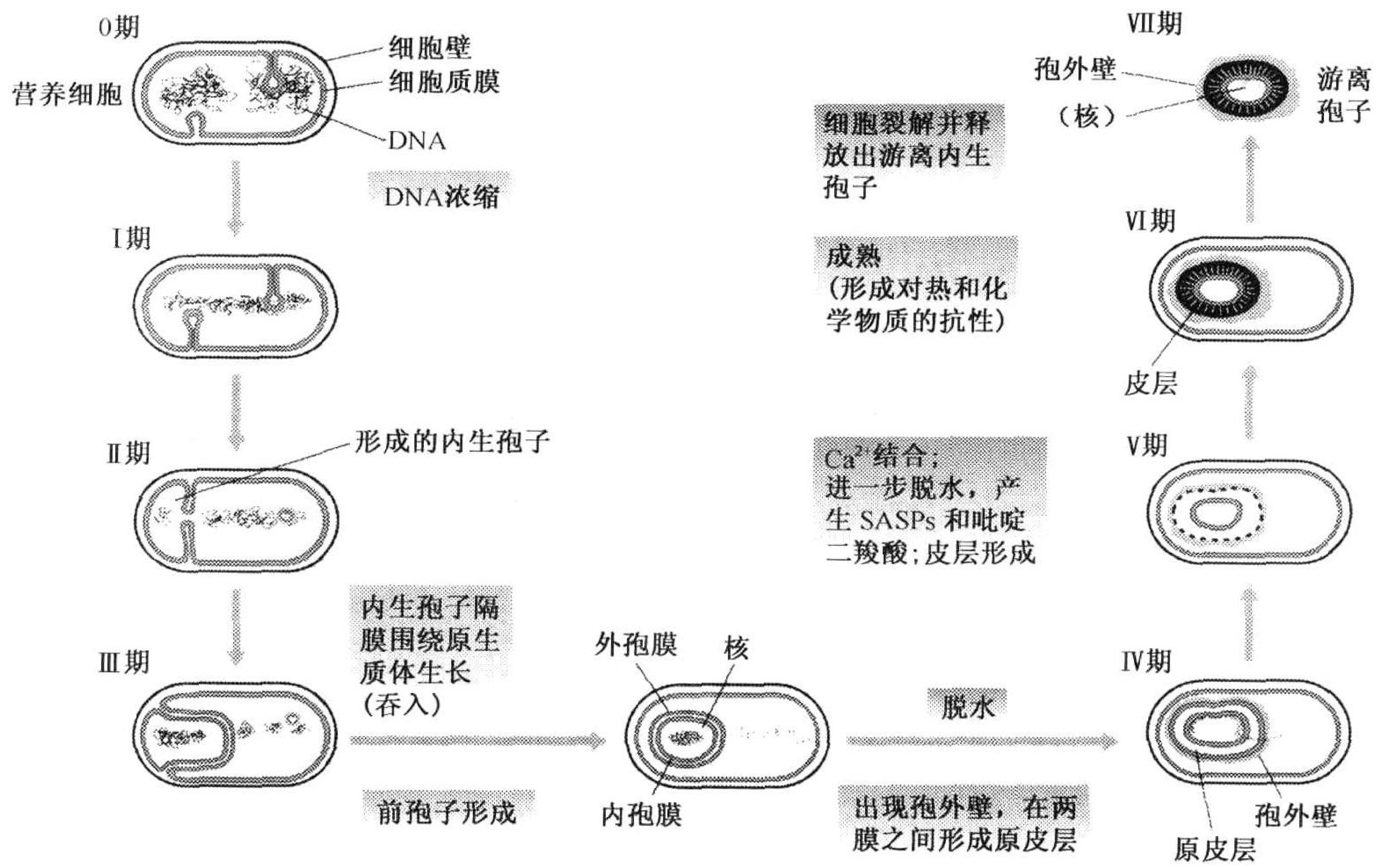


图 4.51　内生孢子形成的阶段。所列出的阶段（0～Ⅶ）是通过遗传研究和显微镜分析法确定的。

萌发

内生孢子能够保持休眠状态许多年（见知识窗），但它可以很迅速地转回营养细胞，这个过程包括三个阶段：激活、萌发、生长（图 4.52）。

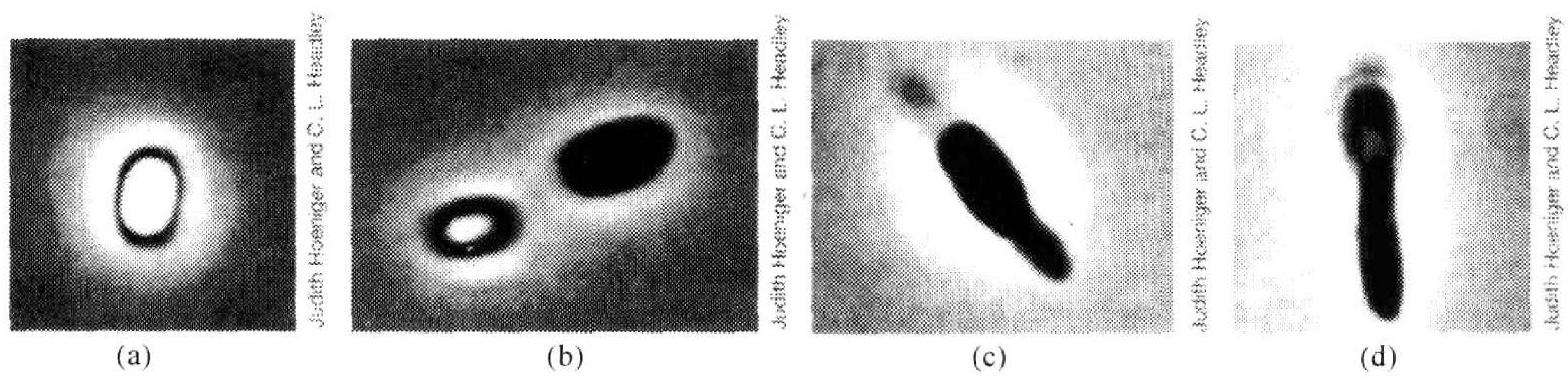


图 4.52　芽孢杆菌内生孢子的萌发。成熟的内生孢子（a）转变成营养细胞（d）；显微照片显示从一个高度折光性的内生孢子萌发的顺序。（b）（激活）折光性丧失，而（c）和（d）新的营养细胞正在长出（生长）。

激活（activation）可以用较高的（但是亚致死温度）温度加热新形成的芽孢几分钟。激活的芽孢置于特殊的养料中就会萌发，如某些氨基酸（丙氨酸）是内生孢子特别好的触发剂。萌发（germination）通常是一个快速过程（几分钟），包括内生孢子显微镜折光性的丧失、对染料的可染性的增加及对热和化学物质抗性的降低。内生孢子中钙-吡啶二羧酸和皮层组分的丧失发生在这一阶段，同时 SASP 降解。最后阶段——生长（outgrowth）阶段，由于吸水和新的 RNA、蛋白质、DNA 的合成，内生孢子明显地膨胀，营养细胞从裂开的芽孢衣中出来，最后开始分裂（图 4.52）。细胞维持营养生

长直到环境信号再次触发芽孢形成。

内生孢子形成的多样性和系统发育

内生孢子的形成范围有多广泛呢？尽管只对芽孢杆菌属（*Bacillus*）和梭菌属（*Clostridium*）少数种的内生孢子形成进行了详细研究，但近 20 个属的细菌已显示能形成内生孢子（表 12.25）。而且，内生孢子存活的许多秘密似乎是更普遍地存在，如钙-吡啶二羧酸复合物的形成（图 4.49）、内生孢子的特殊基因。虽然一些细节会有不同的变化，但内生孢子结构在形成内生孢子的细菌中是相同的。

从系统发育的角度，产生芽孢的能力与革兰氏阳性菌的亲缘关系有关（见 2.5 节和 12.20 节）。尽管这样，形成芽孢细菌的生理学有很大差异，包括厌氧菌、需氧菌、光能营养菌、化能营养菌。鉴于生理多样性，实际引发芽孢形成的因素因种属的不同而不同，除了芽孢杆菌属和梭菌属主要是营养饥饿引发孢子形成外，还有其他的信号。有趣的是，没有发现古生菌形成孢子，说明形成孢子的能力是在数亿年前主要原核生物系分化后的某个时期进化来的（见 2.3 节和图 2.7）。

概念检查

内生孢子是某些革兰氏阳性菌产生的一种高抗性分化的细菌细胞。内生孢子形成导致一个高度脱水的结构，该结构含有重要的大分子和各种物质，如钙-吡啶二羧酸和小酸溶性芽孢蛋白，这些在营养细胞中是没有的。内生孢子可以休眠很长时间，但当条件合适时，可很快萌发。

◆ 什么是吡啶二羧酸，存在于细菌的何种结构中？

◆ 什么是 SASP？它的功能是什么？

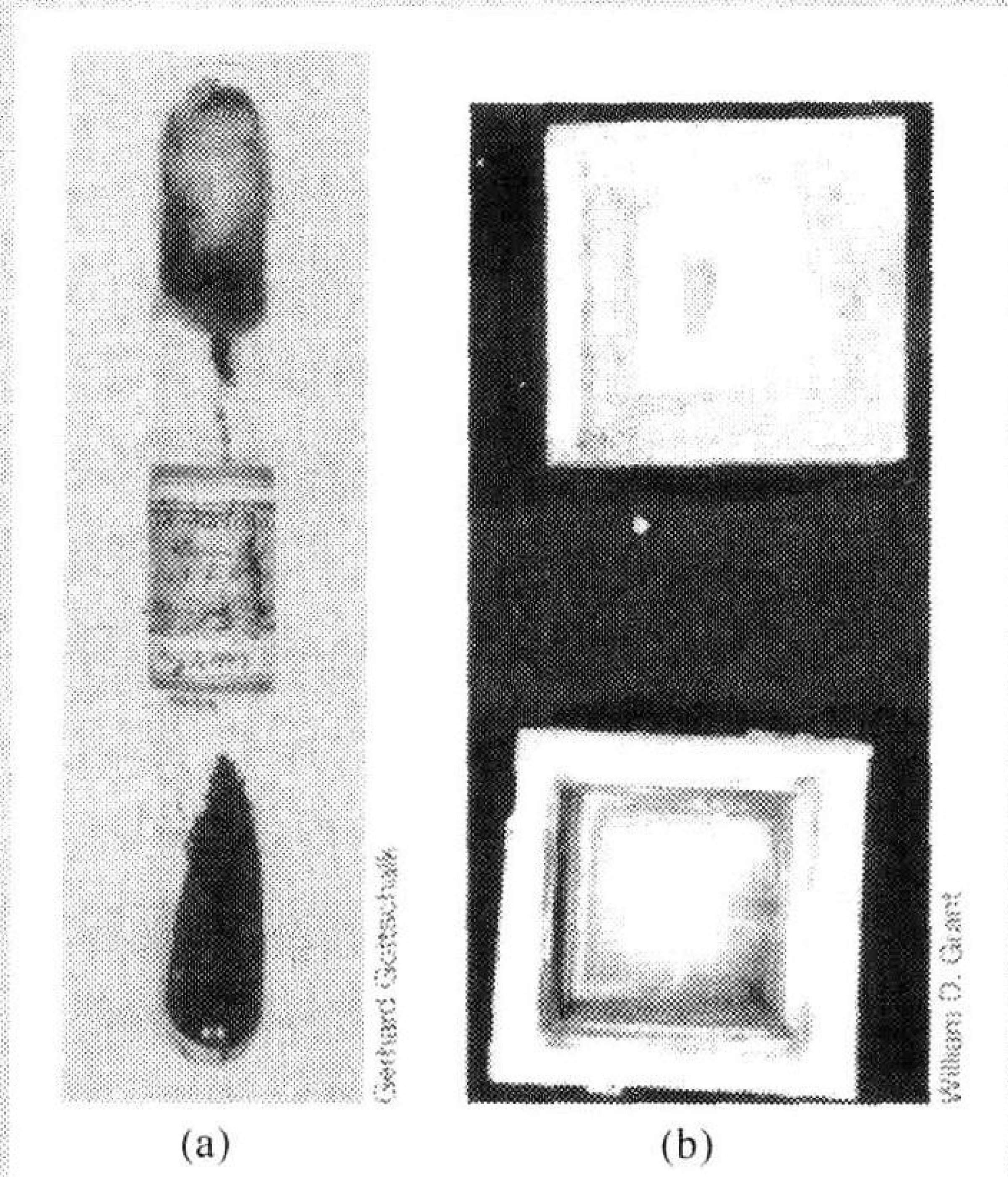
◆ 当一个内生孢子萌发时，会发生什么情况？

知识窗：内生孢子可以存活多长时间？

在这一章中我们讨论了细菌内生孢子的休眠特性及抗性，也指出内生孢子可以休眠很长时间，但是有多长呢？

内生孢子寿命的证据表明内生孢子至少可存活几十年，也许更长（也就是说能萌发成为营养细胞）。醋酸梭菌（*Clostridium aceticum*）的芽孢悬液（图 1a）制备于 1947 年，1981 年把它放在无菌生长培养基中，虽已经过了 34 年，但不到 12h，生长开始，并形成一个粗壮的营养体。醋酸梭菌最初由荷兰人 K T Wieringa 于 1940 年分离得到，但一直被认为丢失了，直到在伯克利的加利福尼亚大学的一间储藏室中发现了装有醋酸梭菌孢子的小瓶，并使其复活[1]。醋酸梭菌是同型乙酸菌，能够将 CO_2 和 H_2 或葡萄糖转化成乙酸（见 17.16 节）。

1 Braun M F, Mayer and G Gottschalk. 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch. Microbiol*, 128: 288～293



(a) (b)

图1 内生孢子的寿命。 (a) 1947年5月7日制备的含有醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*)内生孢子的试管照片，休眠了30多年后，内生孢子悬浮在营养培养基中，12h内开始生长[1]。(b) 含有嗜盐菌盐晶体。这些晶体(直径约1cm)生长在实验室，晶体中含有有活性的盐细菌细胞(橘黄)，晶体类似于报道的二叠纪(约2亿5千万年前)含有活性的嗜盐的并能形成内生孢子的细菌。

另一个内生孢子寿命更长的例子也已被证明。高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)的细菌是嗜热产内生孢子菌类，广泛分布于土壤、植物枯枝落叶和发酵的植物物质中。对2000多年前英联邦的古罗马考古遗址进行微生物学检测，在许多废墟的碎片里，存在大量有活性的高温放线菌的内生孢子。另外，从具有7000多年历史的明尼苏达湖的部分沉积物中也可获得高温放线菌的孢子。虽然这些研究中，污染是可能的，但这些例子中上述两种样本是进行了消除近期内生孢子污染的[1]。

什么因素限制了芽孢寿命？宇宙射线是主要因素，因为它能使DNA发生突变。有假说认为，经过几千年宇宙射线的积累，生物基因组发生突变，即使是高度抗辐射的结构(如芽孢)也会发生基因损伤。然而，从实际的实验测定中用外推法推测自然辐射对内生孢子的效应说明，如果芽孢悬浮物可部分地躲避辐射，如嵌入有机层内，就可保持几十万年的活性，甚至更长。很令人吃惊，这是最高极限吗？

1995年，科学家报道了2500万～4000万年的细菌内生孢子复活[2]。据说这个内生孢子存在于一种已灭绝的蜜蜂的肠内，而这种蜜蜂存在于已知地质年代的琥珀里。以前用显微镜研究这些昆虫的内脏时，发现有类似于内生孢子的结构，而且因为从昆

---

1 Gest H, and J Mandelstam. 1987. Longevity of microorganisms in natural environments. *Microbiol. Sci*, 4: 69～71

2 Cano R J, and M K Borucki. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 268: 1060～1064

虫中发现类似芽孢杆状的DNA，更令人不可思议的是，蜜蜂组织样品放在一个无菌的培养基中培养，很快产生了形成内生孢子的细菌。这个前提是从琥珀蜜蜂中复活形成内生孢子的细菌没有受到现在的污染。还有一个特殊的例子是从2亿5千多万年前的二叠纪的盐晶体流体内含物中分离到嗜盐（喜欢盐）的产内生芽孢细菌[1]，推测这些细胞被陷入含有晶体的海水中（图1b），形成于极长的时期以前，那么它在长达万年仍具有活性。

如果内生孢子长寿这一几乎难以置信的事实已被几个独立实验室重复结果证明（这些证明对于证实这些争论发现是很关键的），那么，储存在合适条件下的内生孢子可以保持存活，这是关于内生孢子的一个有力证明。毫无疑问这个进化结构是为了在短时间内有助于细胞保持存活，但也证明它是一个较为完善的结构，即使不是几百万年，至少在几年到几十万年间，保持休眠状态还是可能的。

1 Vreeland R H, W D Rosenzweig and D W Powers. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407: 897～900

Ⅳ 微生物的运动

我们结束对微生物结构和作用的观察，开始对细胞运动进行研究。许多细胞可以靠它们自己的能量运动。运动使细胞能够到达它们所在环境的不同位置。在为了生存而努力中，向一个新地方的运动可提供细胞一个新的营养和生长机会，并且可以延长其寿命。

在本章最后的几节，我们探讨细胞运动的不同类型，包括游动和滑行。然后讨论运动细胞是如何以定向的方式朝向或远离特定的刺激（该现象称为趋性），以及一些简单的行为反应的例子。

4.14 鞭毛与运动

许多原核生物是可运动的，这种功能依赖于一个特殊结构——鞭毛（flagellum）（图4.53）。某些细菌细胞能沿着固体表面滑行（gliding）（见4.14节），浮游微生物在

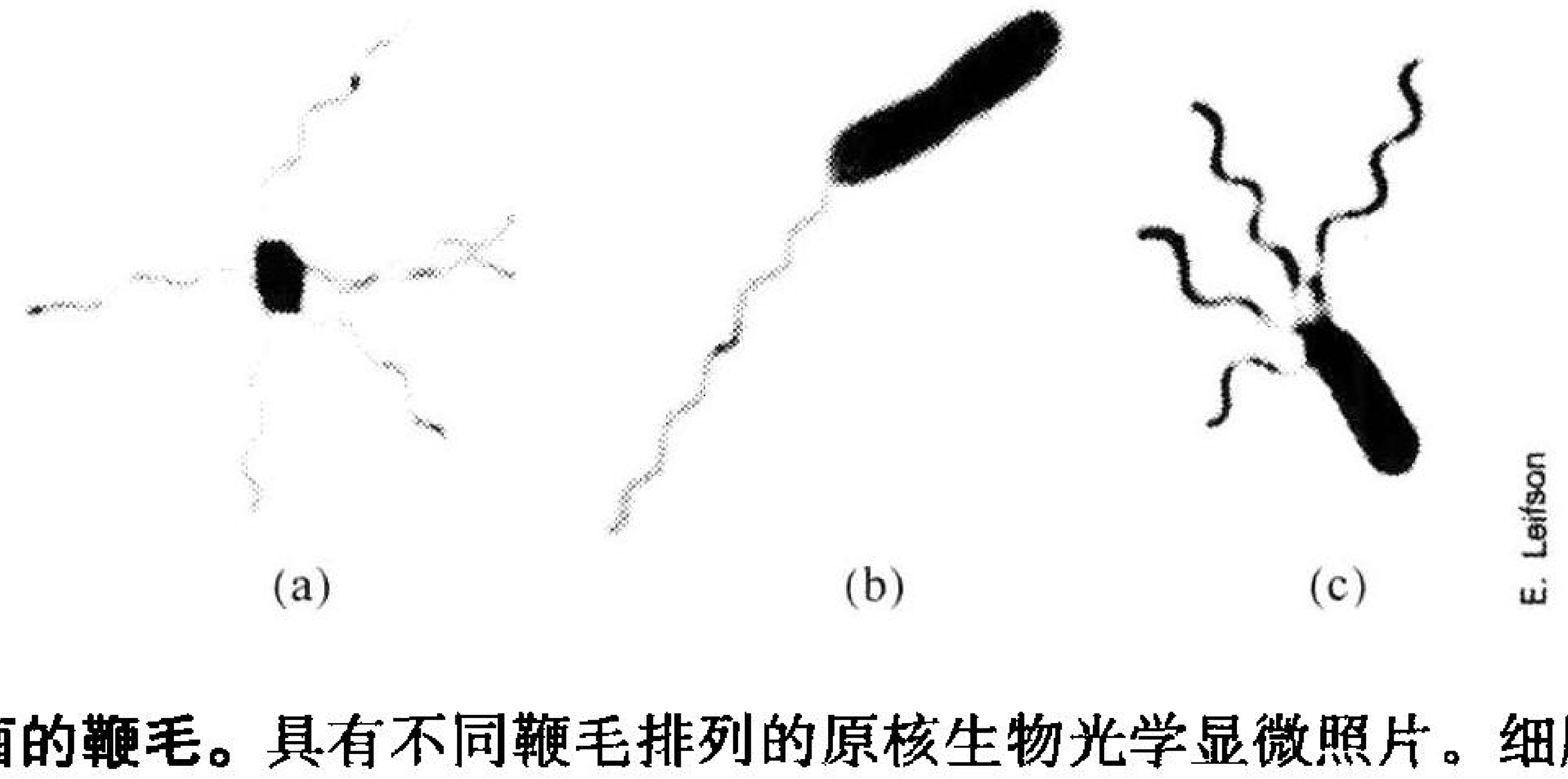
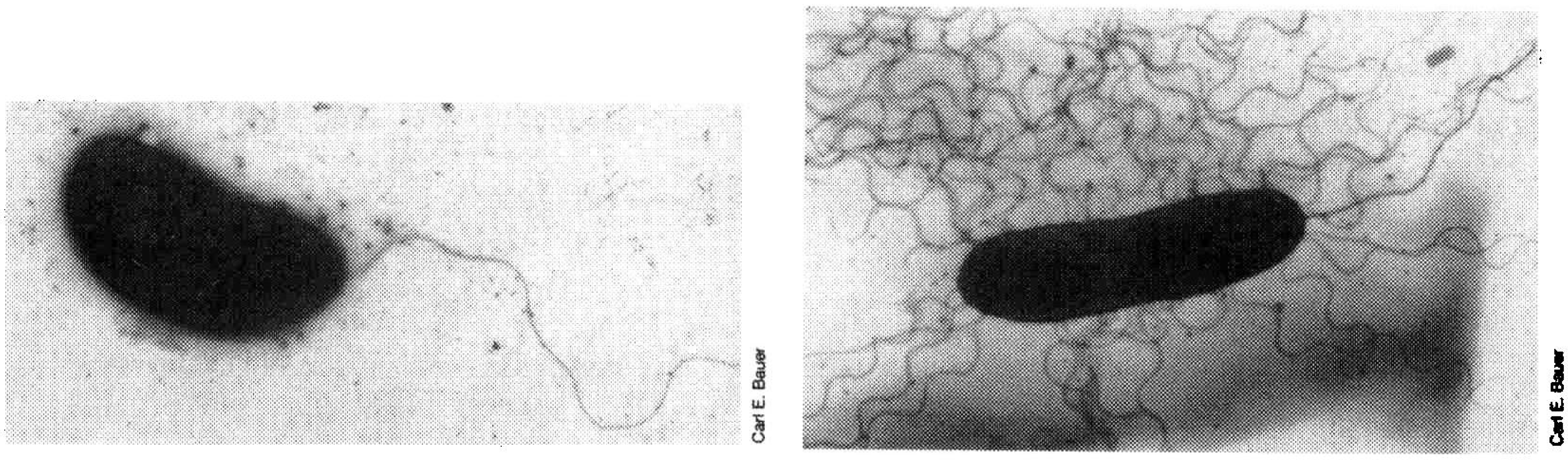


图4.53　细菌的鞭毛。具有不同鞭毛排列的原核生物光学显微照片。细胞是用赖夫松鞭毛染色法染色。(a) 周生鞭毛。(b) 极生鞭毛。(c) 丛生鞭毛。

水中通过一种称为气泡的充气结构（见 4.12 节和 12.25 节）调整它们的位置，但大多数能运动的原核生物都是借助于旋转鞭毛来运动，因此我们开始详细讨论这个过程。

细菌鞭毛

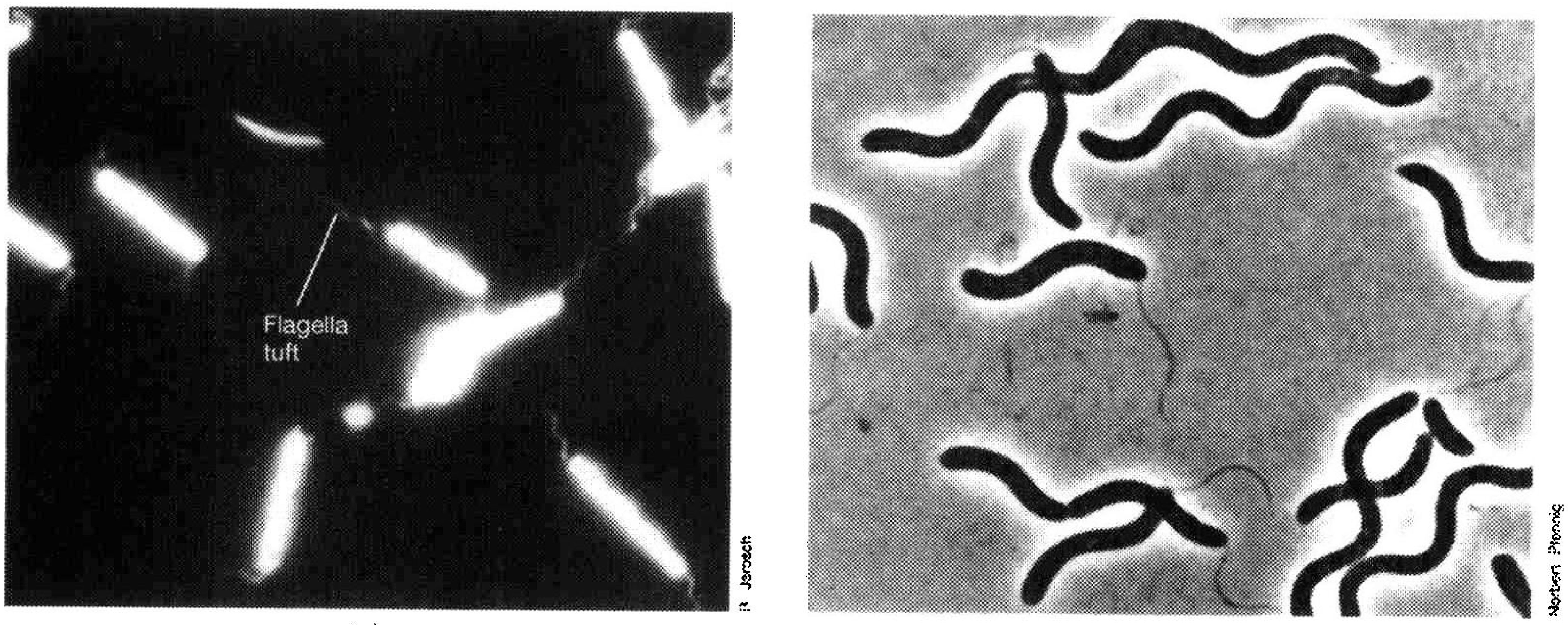
细菌鞭毛是一条又细又长的菌体附器，它一端着生在细胞上，另一端是游离的。鞭毛很细（约 20nm），以至于一根单个鞭毛只有经过特殊的鞭毛染色增加它们的直径后，才能在光学显微镜下观察到（图 4.53），用电子显微镜很容易看到鞭毛（图 4.54）。



(a)　(b)

图 4.54　细菌鞭毛的精细结构。负染后，在透射电子显微镜下的细菌鞭毛。（a）一个极生鞭毛。（b）周生鞭毛。两个显微照片都是光养细菌世纪红篓菌（*Rhodospirillum centenum*）细胞，正常情况下，该细胞是极生鞭毛，而在某些生长条件下形成周生鞭毛的“游动”细胞，也可见图 4.63b。

不同的细菌，鞭毛的排列不同。极生鞭毛菌（polar flagellation）的鞭毛着生在细胞的一端或两端（图 4.53b 和图 4.54a）。有时在细胞的一端着生有一丛鞭毛，这种排列叫丛生鞭毛（lophotrichous）（图 4.53c），用暗视野显微镜可以观察活细胞上的这种类型的丛生鞭毛（见 4.1 节和图 4.55a），鞭毛是亮的，着生在一个亮的细胞上，而背



(a)　(b)

图 4.55　在活体细胞中观察到的鞭毛。（a）每端带有鞭毛丛的一群大型杆状细菌的暗视野显微照片，单细胞约 2μm 宽，暗视野显微镜利用水平照明产生反射光（见 4.1 节和图 4.5c）。（b）大型紫色光养细菌度光红螺菌（*Rhodospirillum photometricum*）的相差显微照片，单细胞约 3μm×30μm，注意丛生鞭毛是从一端发出的。

景是暗的。在一个很大的原核细胞中，用相差显微镜也可观察到丛生鞭毛（图 4.55b）。在周生鞭毛菌（peritrichous flagellation）中（图 4.53a 和图 4.54b），鞭毛着生在细胞表面的许多部位。鞭毛的类型，极生或周生是作为细菌分类的一个特征。

鞭毛的结构

鞭毛不是直的而是螺旋形，平展时，在两个相邻弯曲间表现出恒定的长度，叫做波长（wavelength）。这种波长具有种属特异性（图 4.53～图 4.55）。细菌鞭毛的鞭毛丝由一种蛋白质的亚单位组成，称为鞭毛蛋白（flagellin）。鞭毛的形状和波长一部分由鞭毛蛋白的结构决定，在某种程度上还由鞭毛旋转方向决定。这里要讨论的基本鞭毛结构

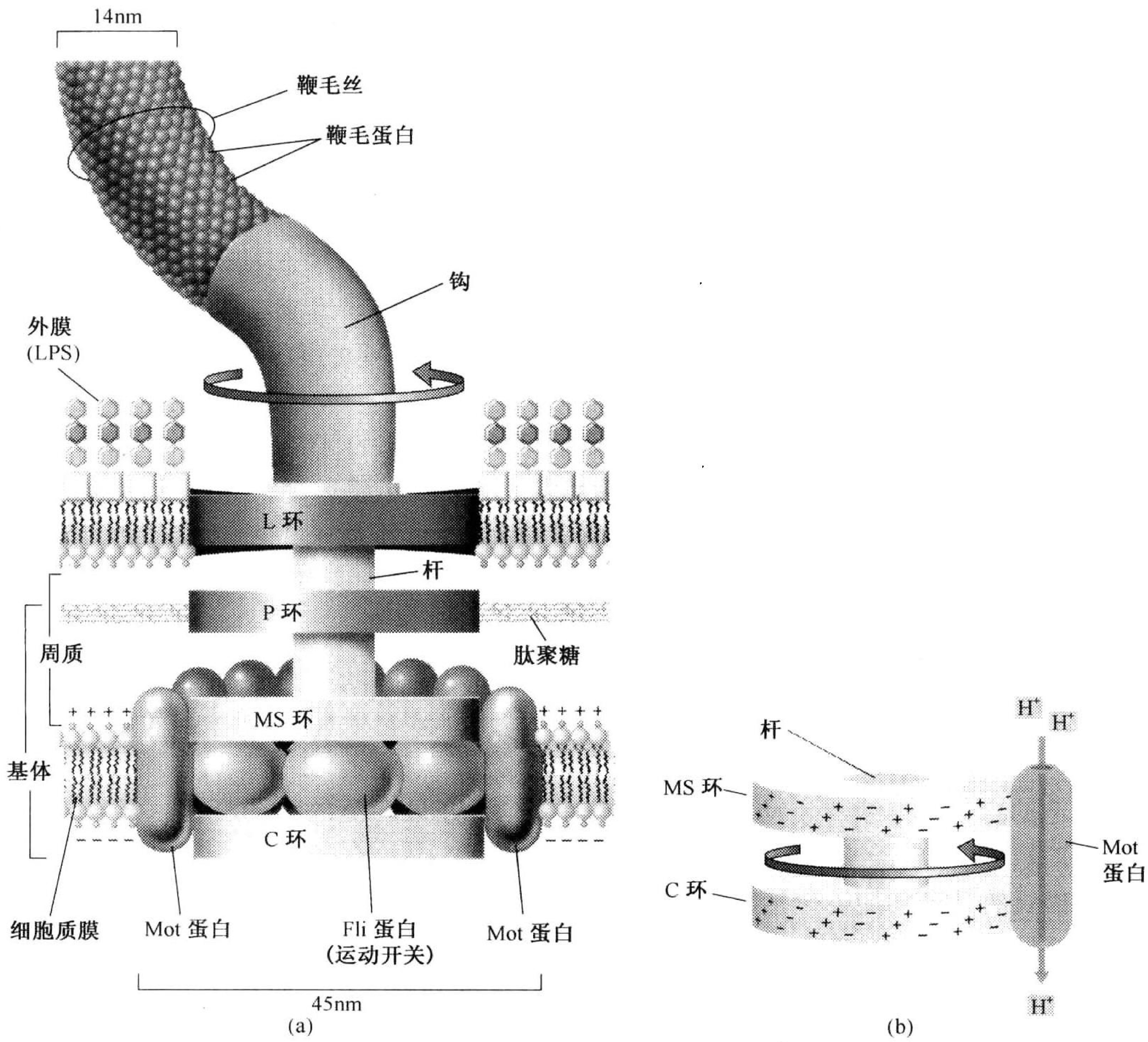


图 4.56　革兰氏阴性菌中原核生物鞭毛的结构和功能。（a）结构。L 环埋于 LPS 层，P 环埋于肽聚糖中，MS 环埋于细胞质膜中，C 环埋于细胞质中。一狭窄的通道存在于杆中，鞭毛丝穿过，这是鞭毛分子扩散到达的鞭毛合成的位点。Mot 蛋白的功能是驱动鞭毛运动，而 Fli 蛋白的功能是控制运动的开关。鞭毛运动是通过旋转鞭毛丝推动细胞穿过基质。（b）功能。提出了一个“质子泵”模型，解释鞭毛的旋转。穿过 Mot 蛋白的质子可能对存在于 C 和 MS 环的电荷施加力量，由此跨过转子。

在细菌不同种中变化很小，然而在古生菌中，尽管鞭毛的功能十分类似，但已知几种不同的鞭毛蛋白和鞭毛结构与细菌的非常不同。在细菌中，鞭毛蛋白是高度保守的，说明鞭毛运动在这些区域有很深的进化根源。

鞭毛由几个部分组成，功能为旋转作用，很像摩托艇的螺旋桨。鞭毛的基部在结构上与鞭毛丝是不同的（图 4.56a）。在鞭毛基部有一较宽区域称为钩（hook），这个钩由一单独类型的蛋白质组成，其功能是将鞭毛丝与鞭毛的运动部分连接起来。

这个运动部分固定在细胞质膜和细胞壁上，由一小的中心杆穿过一系列的环状结构组成。在革兰氏阴性菌中，外侧一个环称为 L 环，固定在脂多糖层，第二个环称为 P 环，固定在细胞壁的肽聚糖层，第三个环称为 MS 环和 C 环，分别位于细胞质膜和细胞质（图 4.56a）。在革兰氏阳性菌中，由于缺少外膜，只有里面的一对环。包围内环且固定于质膜内的是一系列蛋白质，称为 Mot 蛋白（图 4.56a）。最后一组蛋白质称为 Fli 蛋白（图 4.56a），其功能是作为运动开关通过应答细胞内的信号来控制鞭毛的旋转方向。

鞭毛的运动

鞭毛是一个极小的转动马达，这个马达是如何工作的呢？它包括两个部分：转子和定子。在鞭毛马达中，转子（rotor）由 C 环、MS 环和 P 环组成，这些结构构成了基体（basal body），定子（stator）由周围 MS 环和 C 环的 Mot 蛋白组成，作用是产生转力矩。

鞭毛的旋转运动由基体引发，鞭毛旋转所需的能量来自于质子动力（见 4.6 节和 5.12 节），质子通过穿过 Mot 复合体（图 4.56a）来做穿膜运动，并以此驱动鞭毛运动，一些数据表明鞭毛的每一次旋转大约需要转移 1000 个质子。还不知道是如何发生的，但提出的“质子泵”模型解释了可能的实验数据（图 4.56b）。在这个模型中，流过定子通道的质子施加静电力于转子蛋白上螺旋排列的电荷，当质子通过定子时，正负电荷的引力会引起基体旋转（图 4.56b）。

鞭毛的合成

鞭毛的合成及连续的运动需要许多基因。在研究最广泛的大肠杆菌（*Escherichia coli*）和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）中，40 多个基因是运动所必需的，这些基因具有几种功能，包括编码鞭毛器官的结构蛋白，将鞭毛组分从细胞质膜运到细胞外部，还有在新的鞭毛合成中调控其周围的一些生化过程。

每一根鞭毛的生长并不像动物的毛发一样从基部开始生长，而是从尖端生长。首先合成 MS 环，插入到细胞质膜，然后在鞭毛丝形成前合成鞭毛钩上的其他锚定蛋白（图 4.57），细胞质内合成的鞭毛蛋白分子从鞭毛丝内一个 3nm 通道穿出，然后添加到末端形成成熟的鞭毛。在正在生长的鞭毛末端存在一个蛋白质的“帽子”，这个帽子蛋白帮助散开的鞭毛蛋白分子穿过通道并结合在鞭毛末端形成新的鞭毛丝（图 4.57）。鞭毛的生长或多或少是不间断的，直到鞭毛达到其最终的长度。损坏的鞭毛仍然可以转动，并能由新的鞭毛蛋白亚基穿过鞭毛丝通道替换缺失的而得到修复。

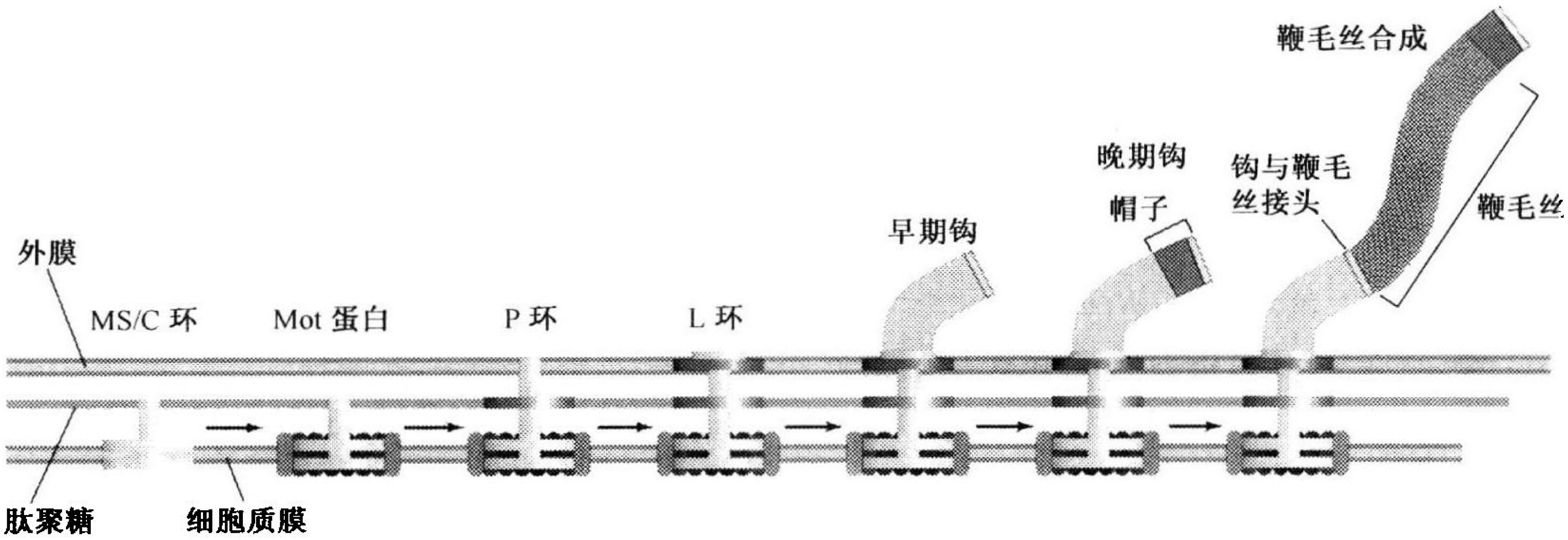


图 4.57 鞭毛生物合成的步骤。合成起始于 MS/C 环在细胞质膜组装，接着形成其他环、钩和帽子。这时，鞭毛蛋白（组装一条鞭毛丝需要约 20 000 个鞭毛蛋白）通过鞭毛钩形成鞭毛丝，鞭毛蛋白分子由帽子蛋白引导到一定位置，以保证最终形成正在生长的鞭毛丝。

细胞速度

鞭毛并不是以一个恒定的速率旋转，而是随质子动力的强度来提高或降低旋转的速度。鞭毛旋转可使细菌以高达每秒 60 个细胞长度的速度在液体介质中运动，虽然这只相当于 0.000 17km/h 的速度，但是每秒钟移动其自身长度的倍数与其他高等生物比较的话，它是相当快的。跑得最快的动物是猎豹，它的最大运动速度约是 110km/h，这仅表示约每秒 25 个体长，因此就体长来说，原核细胞运动速度为每秒 50～60 个体长，实际上比那些大型的生物要快得多。

极生和丛生鞭毛生物的运动与周生鞭毛生物是不同的，这些可以在显微镜下区分。周生鞭毛生物一般以一种慢而稳定的方式成直线运动。而极生鞭毛生物运动较快，旋转着从一个地方冲撞到另一个地方。图 4.58 显示了极生与周生鞭毛生物运动行为的差别，包括鞭毛可逆性的差别。

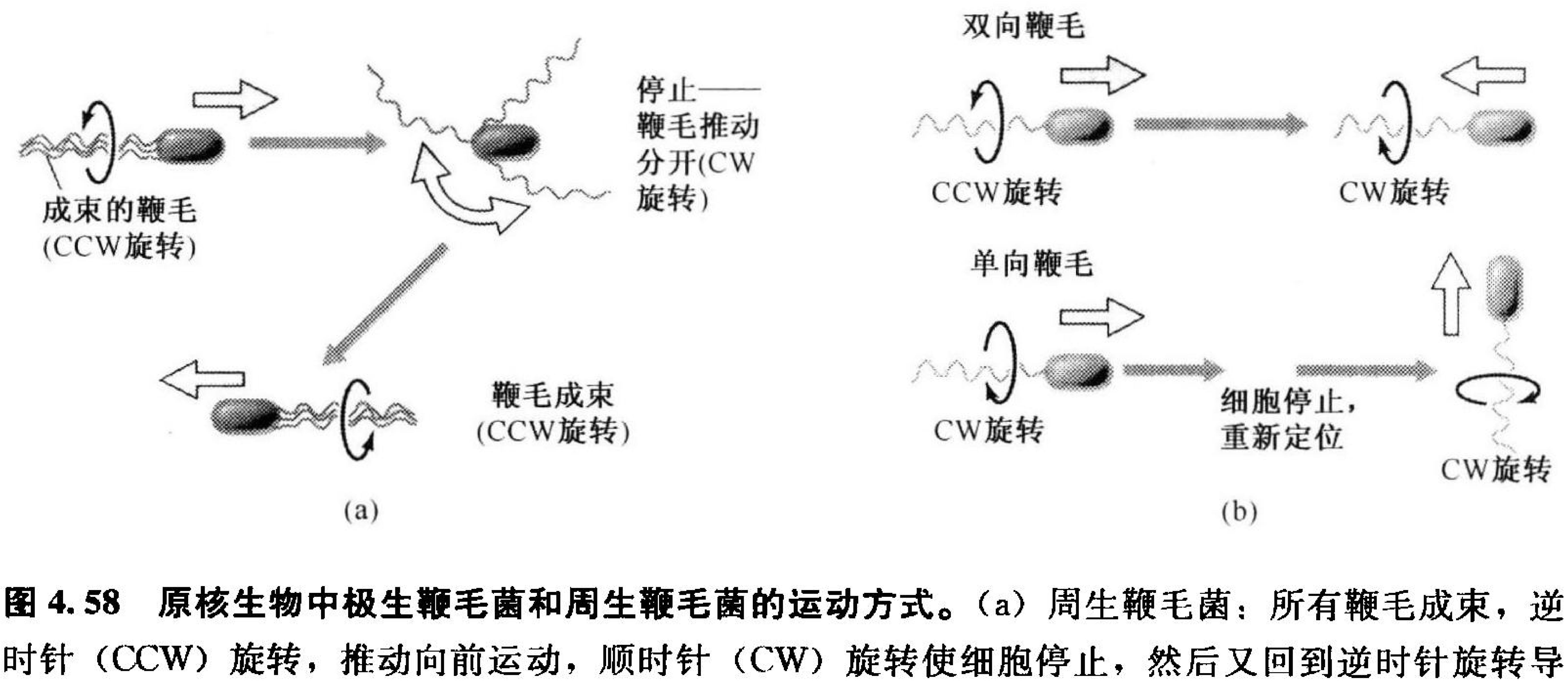


图 4.58 原核生物中极生鞭毛菌和周生鞭毛菌的运动方式。(a) 周生鞭毛菌：所有鞭毛成束，逆时针（CCW）旋转，推动向前运动，顺时针（CW）旋转使细胞停止，然后又回到逆时针旋转导致细胞向新的方向运动。(b) 极生鞭毛菌：细胞可通过颠倒鞭毛旋转方向而改变方向（拉细胞代替了推细胞），或对于单向鞭毛可通过间断停止重新定位，然后鞭毛顺时针旋转向前运动。大的箭头表示细胞运动的方向。

概念检查

多数微生物的运动是由于鞭毛，在原核生物中，鞭毛是由一些蛋白质组成的复杂结构，大部分蛋白质存在于细胞壁和细胞质膜中。鞭毛丝由单一种类的蛋白质组成，通过消耗质子动力来旋转，从而推动鞭毛运动。

◆ 什么是鞭毛蛋白？它存在于何处？

◆ 细菌鞭毛如何使细胞向前运动？

◆ 极生鞭毛与周生鞭毛有何不同？

4.15 滑行运动

某些原核生物可以运动但缺少鞭毛，这些不游动但可以动的细菌在固体表面上运动的过程称为滑行（gliding)。与鞭毛运动不同，带有鞭毛的细胞经常停下，然后转换与开始不同的方向，而滑行运动（gliding motility）是一种更平滑的运动形式，通常沿着细胞长轴发生。滑行运动在细菌中分布广泛，但目前仅有少数种进行了较好地研究。在

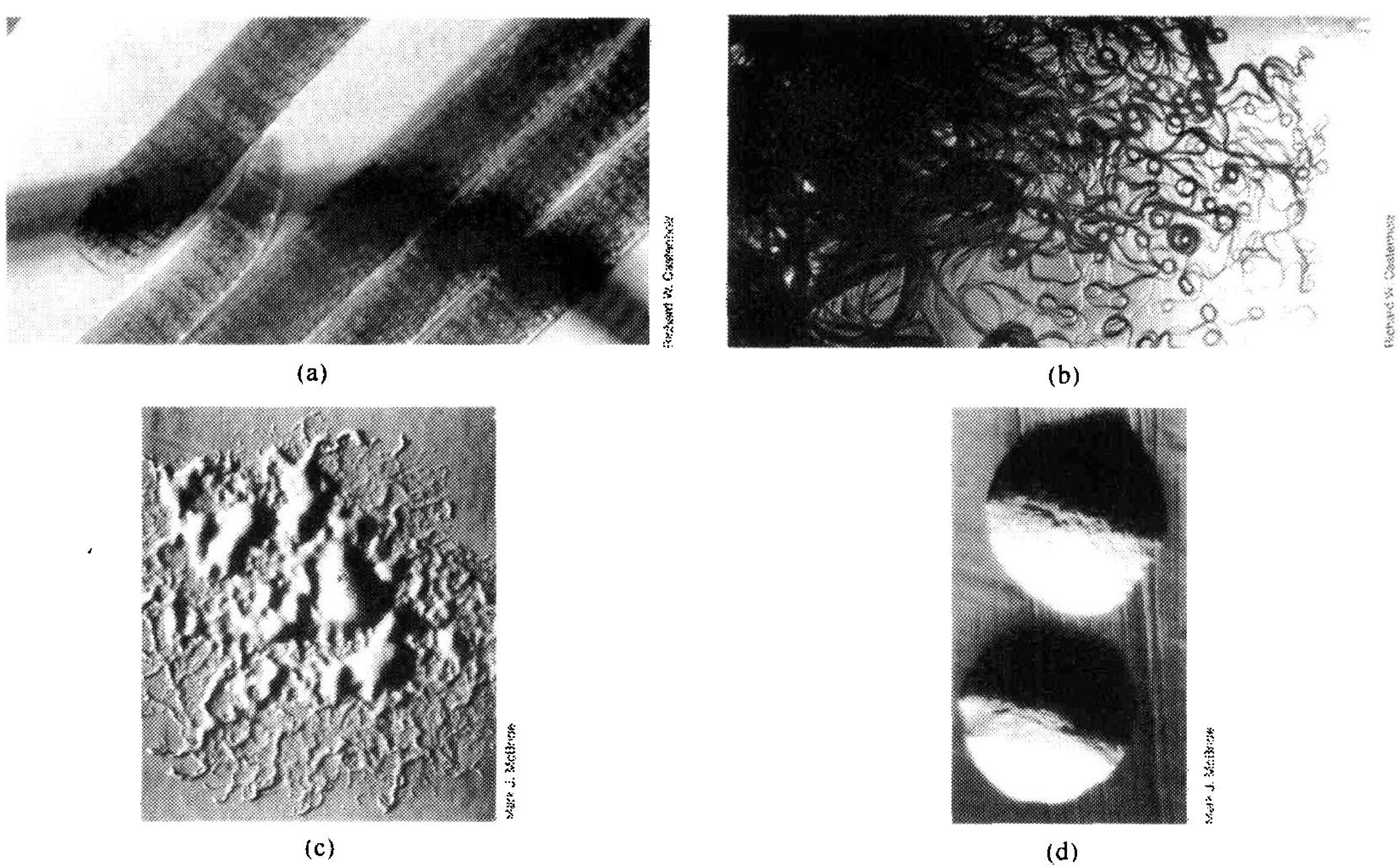


图 4.59 滑行细菌。（a，b）巨型丝状蓝细菌巨颤蓝细菌（*Oscillatoria princeps*)。(a）蓝细菌的显微照片。细胞约 35μm 宽。(b）丝状体在琼脂表面滑行的显微照片。细胞运动可以依靠在固体表面滑行或一个丝状体可以将第二个丝状体作为固体表面进行滑行。（c，d）革兰氏阴性滑行细菌约氏黄杆菌（*Flavobacterium johnsoniae*)。（c）从菌落中心滑行出的细胞团（菌落约 2.7mm 宽)。(d）不能滑行的突变菌株显示出无滑行细菌的典型菌落形态（菌落直径为 0.7～1mm)。有关约氏黄杆菌细胞滑行的机制见图 4.60。

某些滑行细菌（gliding bacterium）中，滑行的速度可以达到 10μm/s，比鞭毛推动的运动慢许多，但它仍然为细胞提供了在其生境运动的一种方式。

滑行原核生物为丝状或杆状细胞（图 4.59），滑行过程需要细胞与固体表面保持接触。由于细胞从菌落中心的滑出和移动（图 4.59c）造成了一般滑行细菌的菌落形态特异（菌落是由单个细菌连续分裂形成的一群细菌，见 5.3 节），最为人们所熟知的滑行细菌是丝状的蓝细菌（图 4.59a，b，见 12.25 节）、某些革兰氏阴性菌，如黏球菌属（*Myxococcus*）和其他黏细菌（见 12.17 节），以及噬纤维菌属（*Cytophaga*）和黄杆菌属（*Flavobacterium*）的某些种（图 4.59c，d 和 12.31 节）。

滑行运动的机制

尽管没有发现较好的滑行机制，但可能不止一种机制。已知蓝细菌（图 4.59a，b）细胞外表面分泌的多糖黏液用于滑行，黏液连着细胞表面和固体表面，滑行细胞依靠它们运动。当分泌的黏液附着在表面时，细胞沿着黏液被拉动，这种假说通过观察几种丝状蓝细菌细胞表面分泌黏液的小孔而得到支持。

黏液挤压式不是非光氧型滑行细菌的滑行机制。例如，约氏黄杆菌（*Flavobacterium johnsoniae*）并不分泌黏液。而是细胞表面蛋白的运动被鉴别为可能的滑行机制。约氏黄杆菌中，锚定在细胞质和外膜的特殊运动性蛋白被认为是以一种连续的齿轮机制推动细胞向前运动（图 4.60）。细胞质膜蛋白的运动是由质子动力释放的能量推动的（见 4.6 节和 5.12 节），并且由于某种原因它们还将这些能量传递给沿着细胞表面的外膜蛋白，这就是蛋白质与固体表面的相对运动拉动细胞向前运动的假说（图 4.60）。

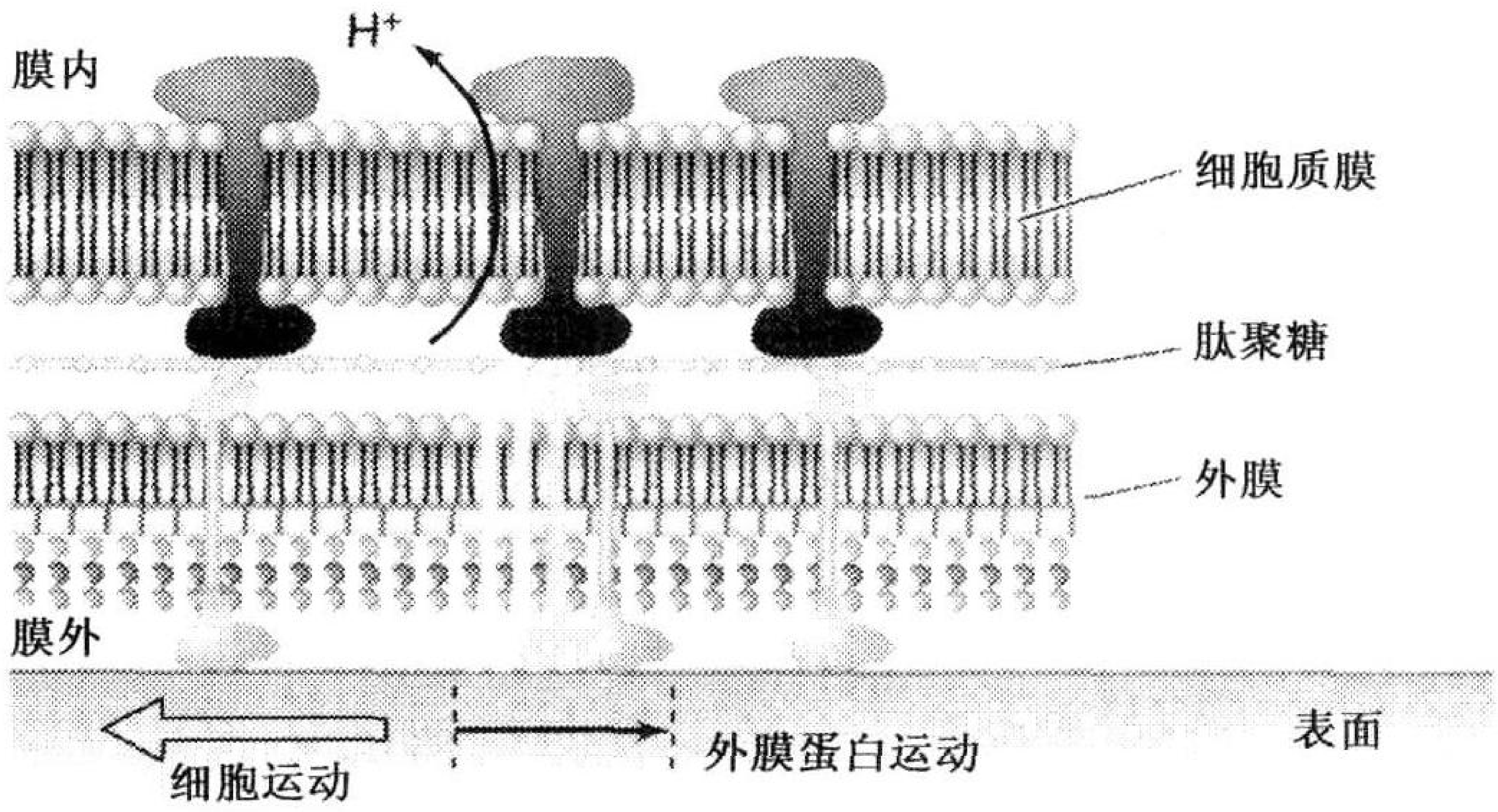


图 4.60　约氏黄杆菌和某些其他滑行细菌中滑行运动如何发生的模型。 足迹（黄色）被认为存在于肽聚糖中，它连接细胞质蛋白（棕色）和外膜蛋白（橘黄色），推动细胞沿固体表面运动。注意外膜蛋白的运动方向和细胞本身的运动方向不同，蛋白质的推动力与质子动力的损耗有关。

与其他运动形式相同，滑行运动具有重要的生态学相关性。滑行允许一个细胞去利用新的营养，或以某些有益的方式与其他细胞相互作用。在后一种关系中，有意思的是一种典型的滑行细菌——黏细菌，它有一种非常社会和合作的生活方式，滑行运动在细胞与细胞间相互作用方面起着重要作用。

概念检查

原核生物的滑行运动不是利用旋转的鞭毛，而是通过几种可能的机制沿着固体表面慢慢地移动。

- 滑行运动与游泅运动在机制和需要上有何不同?
- 比较丝状蓝细菌和黄杆菌属（*Flavobacterium*）的滑行运动机制。

4.16 细胞运动作为一种行为反应：趋化性和趋光性

原核生物在自然界中常遇到物理或化学梯度，细胞的进化意味着通过朝向或背向信号分子对这些梯度做出反应，这种反应取决于该物质是有利的还是有害的，这种有方向性的运动称为趋性（taxs）。趋化性（chemotaxis）是指对化学物质的反应，趋光性（phototaxis）是指对光的反应，这是两种人们广泛了解的趋性，在这里我们大体上了解一下趋性，我们将在 8. 13 节中详细讨论趋化性及其规律性，将其作为所有原核生物趋性的一种模式。

趋化性作为一种现象已在游泅细菌中做过很好的研究，在遗传水平上关于环境化学水平如何传递给鞭毛组装的问题了解了很多。因此，我们这里讨论仅涉及游泅细菌本身，而一些滑行细菌也显示了趋化性，丝状的蓝细菌也存在趋光运动。尽管机制未知，但滑行细菌像游泅细菌一样，肯定能以某种方式与其运动器官相连。

趋化性

为理解趋化性，让我们关注一下单个细菌细胞遇到一种化学梯度的引诱剂时的行为（图 4. 61)。与较大的生物不同，原核生物太小，无法感受到沿着一个单细胞长度的梯度，而是当运动时，比较原核细胞现在与几秒前的环境中的物理或化学状态。换句话说，当细菌运动时，它对信号分子梯度的反应是时间上的（而不是空间上的)。

很多关于趋化性的研究都是用周生鞭毛细菌（如大肠杆菌）来进行的。当没有梯度时，大肠杆菌以随机的方式运动，包括细胞以平滑的方式向前游动和当细胞停顿并跳动时发生翻转（图 4. 61a)。翻转后的下一个运动方向是随机的（图 4. 61a)。因此，通过游动和翻转的方式，细胞是在环境中随机地运动，但并不是真正地去哪个地方。

然而，如果化学引诱剂梯度存在时，这些随机的运动发生偏移。当生物体感受向着较高浓度的引诱剂运动时（通过对环境中的化学浓度定期取样)，运动时间变长而翻转频率减少，这种行为反应的最终结果是生物体朝着引诱剂浓度梯度增加的方向运动（图 4. 61b)。

如果生物体感觉到一种驱避剂的存在，机制是相同的，但在这种情况下是驱避剂浓度减少（而不是引诱剂浓度增加）促进运动。当鞭毛发动机逆时针方向旋转时，细胞在平滑运动中是向前运动的，当鞭毛顺时针方向旋转时，鞭毛束分开，向前运动停止，细胞翻转（图 4. 58 和图 4. 61)。

这种情况在极生鞭毛细胞中有些不同。很多极生鞭毛细菌，如假单胞菌属

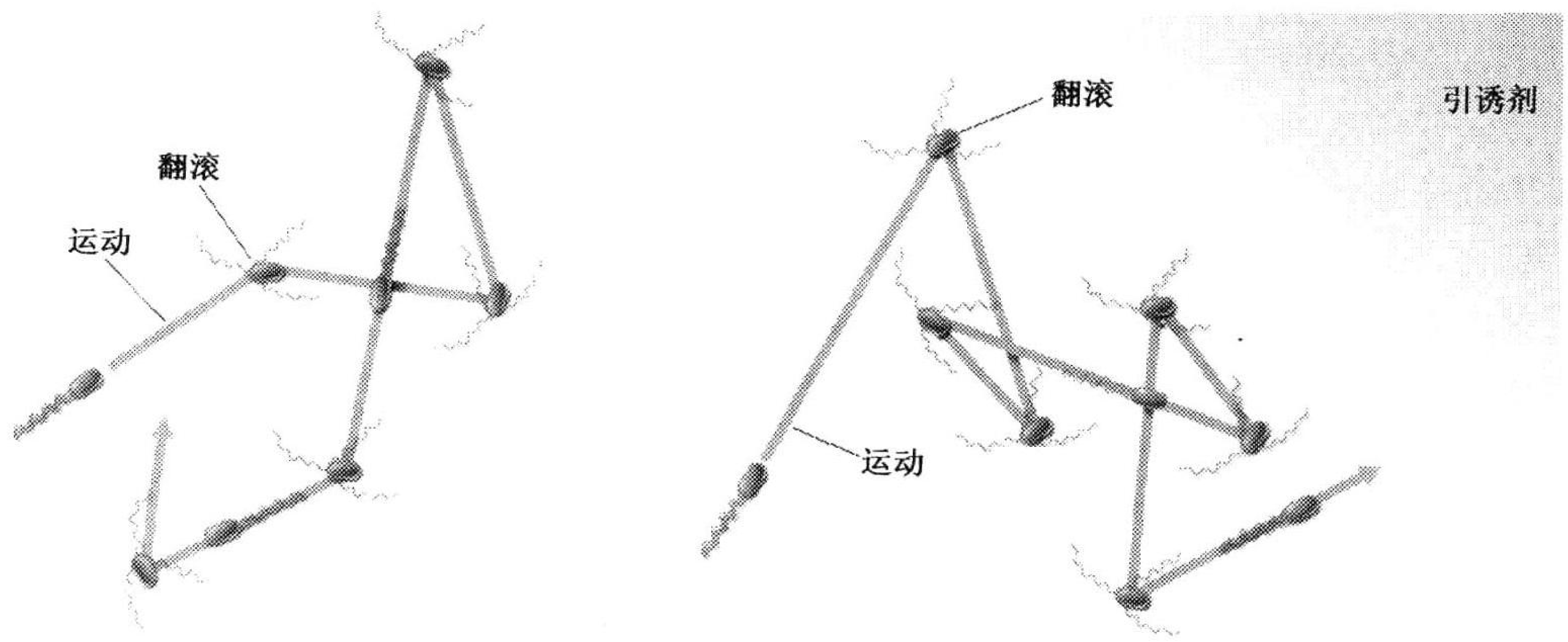


图 4.61　一个周生鞭毛细菌如大肠杆菌的趋化性。(a) 在没有化学引诱剂时，细胞随机运动，通过停止改变方向；(b) 存在化学引诱剂时，运动变成有倾向性，细胞向着引诱剂梯度运动。

(*Pseudomonas*) 的种，可以翻转它们鞭毛的旋转方向，像周生鞭毛细胞一样，也以这种方式翻转方向（图 4.58b)。然而，有些极生鞭毛细菌，如光氧细菌类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 是单向鞭毛，只是以顺时针方向旋转，这种细胞是如何改变方向并进行趋化性的呢?

只有单根鞭毛的类球红细菌包埋在细胞一端，旋转的鞭毛间断地停止，在此期间细胞通过布朗运动随机地改变方向。当鞭毛再一次开始旋转时，细胞移向新的方向（图 4.43b)。类球红细菌细胞对各种碳复合物有强烈的趋化性，对氧气和光也显示了趋性反应。尽管它不能翻转它的鞭毛马达，但类球红细菌的趋化性与大肠杆菌相似的方式进行：增加引诱剂梯度，将保持类球红细菌鞭毛旋转，而降低引诱剂梯度或增加驱避剂梯度将使细胞停止并重新定位。

测定趋化性

细菌是如何用瞬时化学浓度的改变来控制鞭毛旋转的呢? 这是一个复杂的、涉及许多遗传和生化水平上的问题（见 8.13 节)。现在，可以肯定地说趋化性的分子机制涉及细胞质膜中的感觉蛋白，这些蛋白质称为化学感受器 (chemoreceptor)，可以感觉一段时间的化学梯度并与细胞质蛋白相互作用影响鞭毛的运动方向。由于鞭毛旋转方向控制着细胞的运动和翻转，因此趋化性可以认为是一种在化学上控制感觉反应系统而影响鞭毛的功能。

细菌趋化性可以用下面这个实验证明，将一个小的盛有引诱剂的小玻璃毛细管浸入不含有引诱剂的能运动细菌悬液中。从毛细管的顶部开始，在周围介质中形成一个梯度，随着距顶部距离的加长，化学浓度逐渐降低（图 4.62a)。当引诱剂存在时，细菌就会朝着毛细管运动，在开口的顶部聚集成群（图 4.62b)，因此许多运动的细菌就进入毛细管。然而，由于随机运动，即使毛细管含有与介质相同组分的溶液，一些细菌也会进到毛细管里（图 4.62c)。但如果毛细管中存在引诱剂，那么毛细管内的细菌浓度要比管外浓度高出许多倍。

另一方面，如果毛细管中含有驱避剂，毛细管内的细菌浓度要比管外低许多（图4.62d），在这种情况下，细胞感受到驱避剂梯度的增加，特殊的化学感受器会影响鞭毛旋转，使细胞远离驱避剂。用毛细管的方法，可以观察到化学物质对于一个指定细菌是引诱剂还是驱避剂。

趋化现象也可以在显微镜下观察。用摄像机记录细菌细胞随时间变化的每个位置，显示每个细菌的足迹，这样可以观察细胞的趋化运动（图4.62f）。这种方法适于研究自然环境中细菌的趋化性。认为自然界中细菌主要的趋化剂是从更大的微生物细胞或活或死的大型生物中分泌出来的营养物。例如，藻类产生有机复合物和氧气（O_2来自光合作用），可以刺激向藻细胞的趋化运动（图4.62f）。

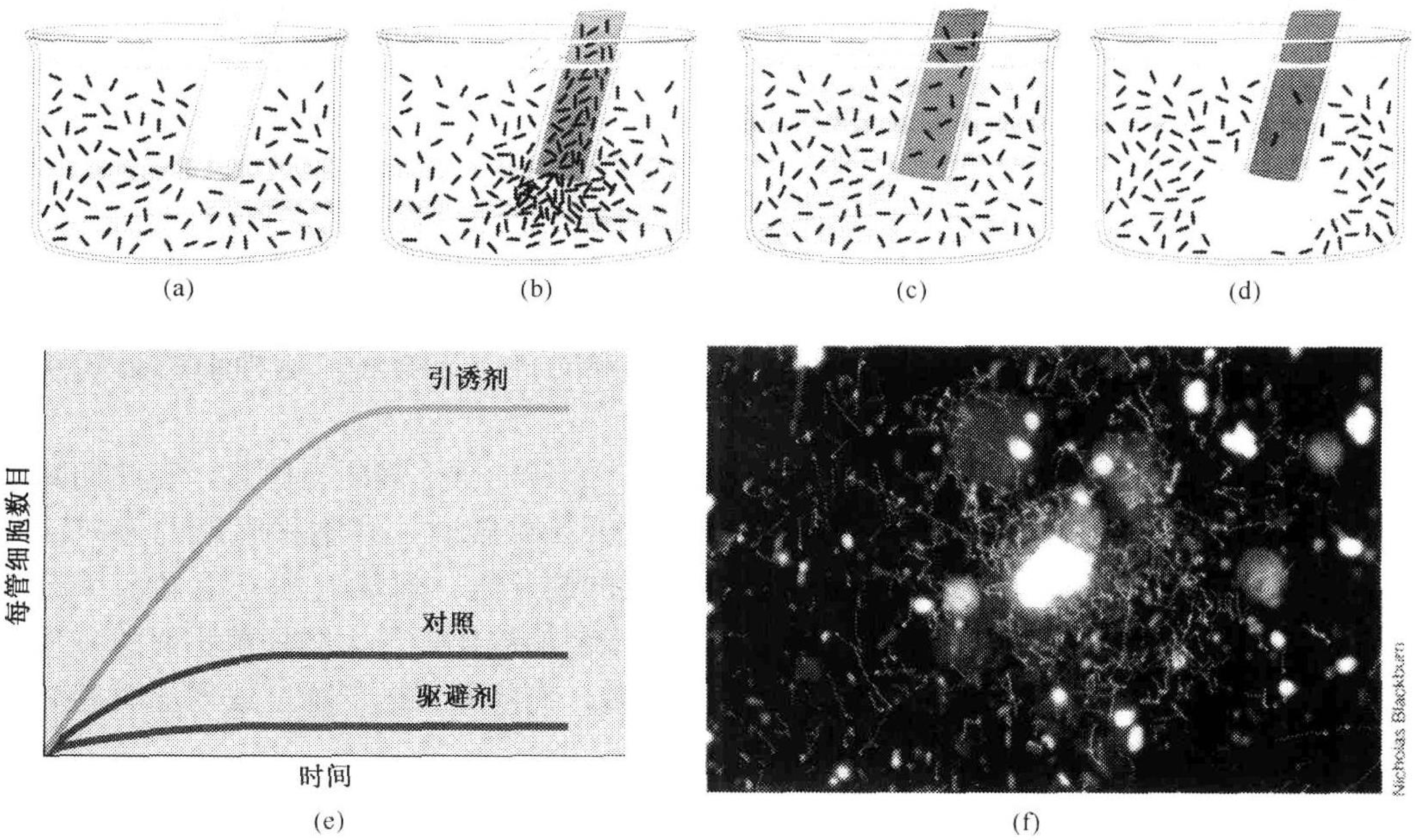
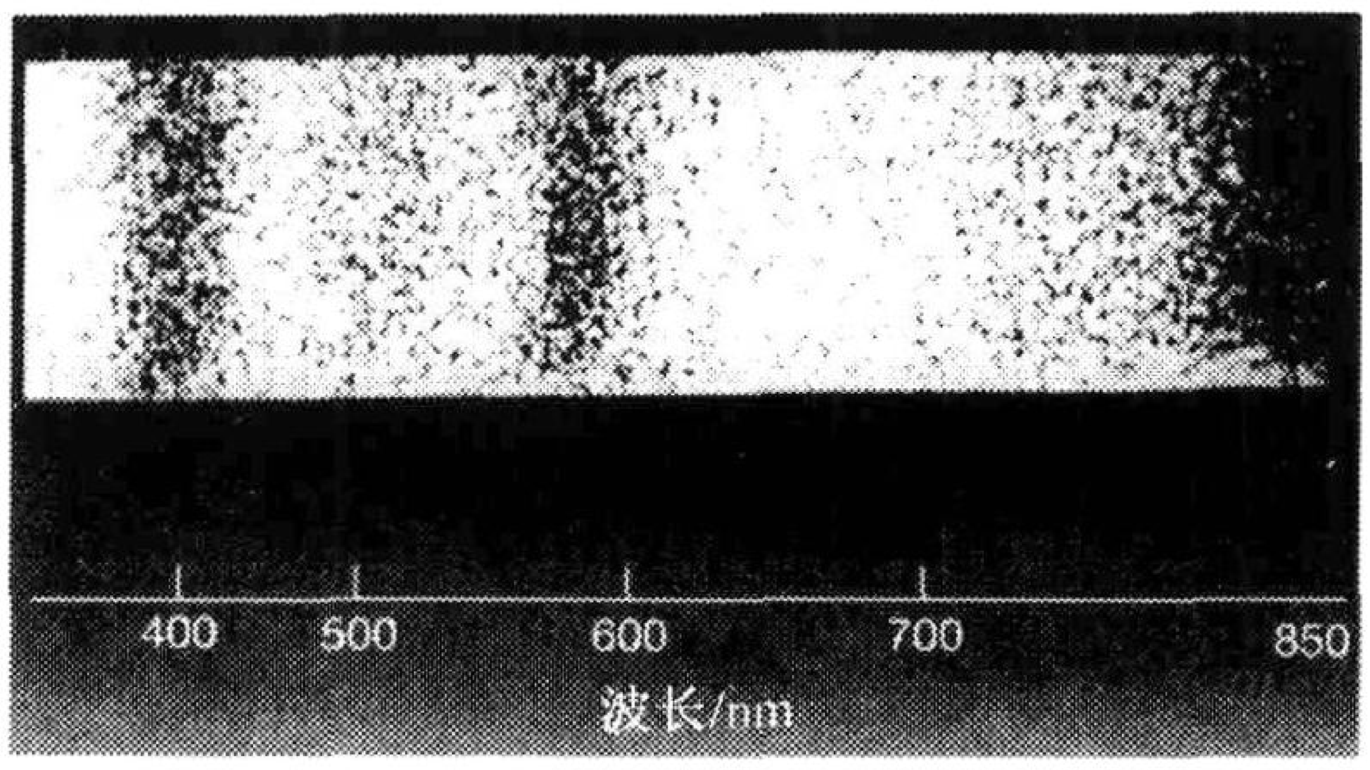


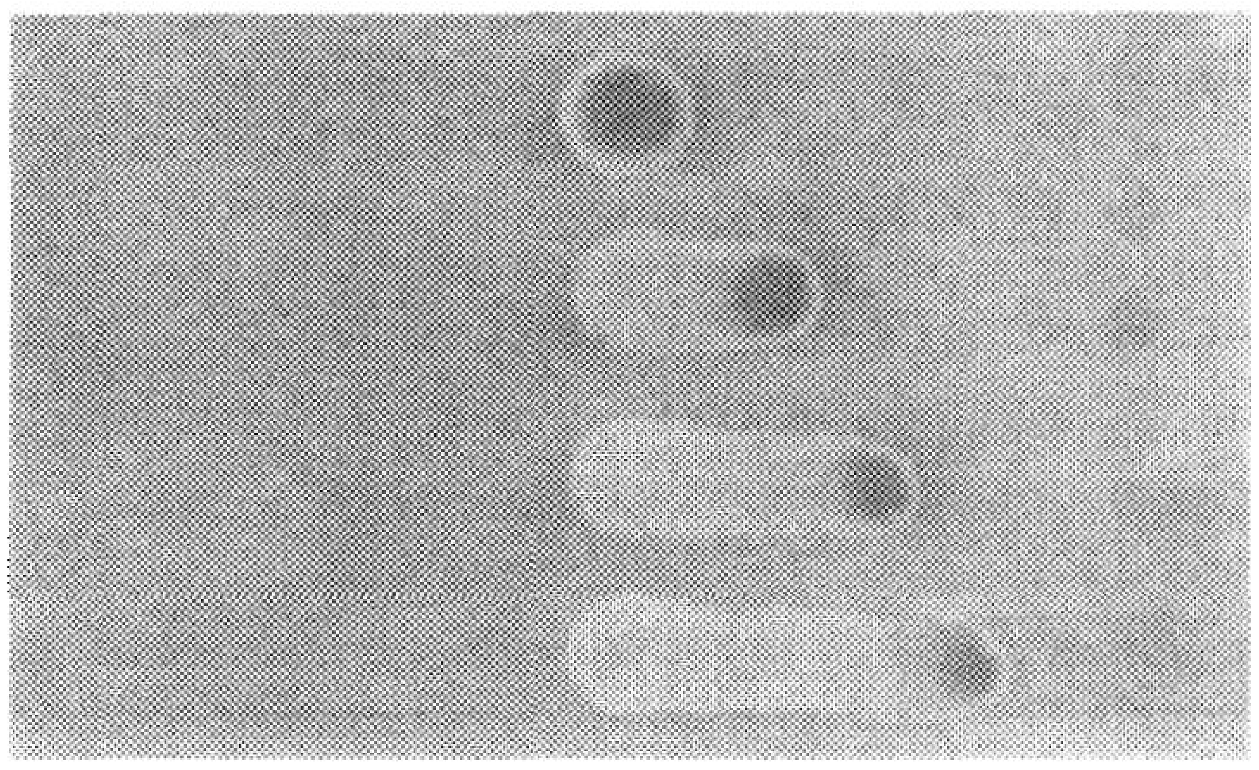
图4.62 趋化性。（a～e）测量细菌趋化性的技术。（a）把毛细管插入细菌悬浮液中，当毛细管插入时，开始形成梯度。（b）细菌在含有引诱剂的毛细管中积累。（c）对照毛细管含有的盐溶液，它既不是引诱剂也不是驱避剂，毛细管内的细胞浓度变得与管外相同。（d）驱避剂使细菌相斥。（e）时间曲线显示了含有各种化学物质的毛细管中的细胞数。（f）运动细菌在海水中围绕一个藻细胞（中央大的白色亮点）游动的足迹，是用带有显微镜的示踪摄像系统拍摄的。注意细菌细胞是如何显示向产生氧气的藻细胞运动的正向趋氧性。细胞的平均速度约为25μm/s，藻的直径约为60μm。

趋光性

许多光养微生物趋向光运动，这一过程称为趋光性（phototaxis）。趋光性的好处在于使光养生物定位自己，最有效地获得光进行光合作用。这里显示的是如果一光谱分布在涂有可以运动的光养细菌的显微镜载玻片上，则细菌集中在它们的光合色素所能吸收的波长区域（图4.63；见17.2节和17.3节对光合色素的讨论）。



(a)



(b)

图 4.63　趋光性。（a）光养细菌耶拿硫螺旋菌（*Thiospirillum jenense*）在其色素吸收的光波区域趋光聚集。在含有浓的细菌悬浮液的显微镜载玻片上，经一段时间后，细菌有选择得聚集。进行显微照相显示的一种光谱，出现聚集的那个波长就是菌绿素 a 吸收的波长（与图 17.3b 比较）。（b）紫色光养菌世纪红篓菌（*Rhodospirillum centenum*）一个完整菌落在 2h 内的趋光性（最上部为 0），这些趋光性细胞强烈地一致向右侧光源运动。见图 4.54 世纪红篓菌细胞的电子显微照片。

从光养原核生物中观察到两种趋性。一种叫避暗趋光性（scotophobotaxis），只可以从显微镜下观察，这种现象发生在当光养细菌碰巧游动到显微镜亮视野外面的黑暗区时，进入黑暗对细胞能量体系造成消极影响，信号使细胞翻转，改变方向，立即又以直线运动，重新进入光区。除了避暗趋光性，光养微生物还可进行真正的趋光性，直接向着光强度增加的光梯度方向运动。这个类似于正趋化性，只是引诱剂是光而不是化学物质。在一些物种中，如高度运动的光氧生物世纪红篓菌（*Rhodospirillum centenum*）（图 4.54），其整个菌落的细胞显示了趋光性，一起向光运动（图 4.63b）。

有很好的理由相信控制趋化性的一些调控系统也调控趋光性，包括特殊的细胞质蛋白（Che 蛋白），它控制鞭毛旋转的方向（见 8.13 节），这个结果来自对缺乏趋光性光养细菌突变株的研究，这些突变株一般也缺乏趋化性系统。光学感受器类似于化学感受器，只是感觉的是光梯度而不是化学梯度，来控制趋光性反应。当向光强度增加的方向运动时，光学感受器与影响鞭毛旋转方向的细胞质蛋白相互作用，以保持细胞运动。因此，尽管趋化性和趋光性的刺激物不同，但是相同的细胞质机制用于处理两种类型的信号。

其他趋性

细菌其他趋性，如靠近或远离氧气运动［趋氧性（aerotaxis），图 4.62f］，靠近或远离高离子强度运动［趋渗性（osmotaxis）］，这些已开始在分子水平上逐渐了解。在所有这些简单的行为里，有一种共同的机制——细胞周期性地感受环境，通过一个感受网络处理感受信息，并反映给那些控制鞭毛旋转方向的蛋白质。因此，从行为学观点来看，能运动的原核生物可很好地适应环境中的化学或物理条件，通过靠近或远离各种刺激物，细胞可以成功地与微生物群落中的其他物种竞争。

概念检查

运动的细菌对环境中的化学和物理梯度有反应，在趋化性和趋光性过程中，通过控

制运动和翻转，原核细胞的随机运动可以靠近和远离刺激物。鞭毛的旋转方向控制着生物的运动形式，反过来，感受网络和反应蛋白又控制着鞭毛的旋转方向。

◆ 趋化性定义。

◆ 是什么引起运动及翻转的?

◆ 避暗趋光性与趋光性有何不同?

复习题

1. 用光学显微镜时，染色的作用是什么? 为什么一般染色用阳离子染料? (见 4.1 节)
2. 微分干扰相差显微镜相对于明视野显微镜的优势是什么? 相差显微镜相对于明视野显微镜的优势是什么? (见 4.2 节)
3. 电子显微镜相对于光学显微镜的主要优势是什么? 哪种类型的电子显微镜用于观察细胞的三维图像? (见 4.3 节)
4. 原核生物的主要形态是什么? 画出你所列出的每种形态。原核生物有多大? 多小? 为什么可能已知的低限要比上限更精确? 大肠杆菌的直径是多少? (见 4.4 节)
5. 用一句话描述单位膜的结构。(见 4.5 节)
6. 用一句话解释为什么离子型分子不易通过细胞的细胞质膜屏障? 这些分子是如何穿过细胞质膜的? (见 4.5 节和 4.6 节)
7. 描述细菌与古生菌膜主要的化学区别。(见 4.5 节)
8. 大肠杆菌细胞通过乳糖通透酶系统吸收乳糖，通过磷酸转移酶系统吸收葡萄糖，通过 ABC-转运蛋白吸收麦芽糖，请对每种糖进行如下描述: (1) 转运系统的组分; (2) 驱动转运系统的能量来源。(见 4.7 节)
9. 为什么细菌细胞壁的坚硬层称为肽聚糖? 肽聚糖结构的细胞壁坚硬性的化学原因是什么? (见 4.8 节)
10. 为什么蔗糖能够稳定被溶菌酶溶解的细菌细胞? (见 4.8 节)
11. 列出革兰氏阴性菌外膜的几种功能。外膜的化学组分是什么? (见 4.9 节)
12. 原核生物多糖层具有什么功能? (见 4.10 节)
13. 原核生物形成什么类型的细胞质内含物? 内含物聚 β-羟基丁酸 (PHB) 和磁小体在组成及代谢作用上有何不同? (见 4.11 节)
14. 气泡的功能是什么? 这些结构是如何形成而使它们可以保持不透气的? (见 4.12 节)
15. 简述细菌内生孢子和营养细胞在结构、化学组成和抵抗极端环境条件的能力有何不同。(见 4.13 节)
16. 定义以下术语: 成熟的内生孢子、营养细胞和萌发。(见 4.13 节)
17. 内生孢子在“失去活力”的状态下，能保持生存力多长时间，这就是说，这方面的证据是什么? (见 4.13 节)
18. 描述细菌鞭毛的结构与功能。什么是鞭毛的能量来源? (见 4.14 节)
19. 黄杆菌属滑行运动机制与大肠杆菌运动机制有何不同? (见 4.15 节)
20. 简述运动的细菌是如何感觉引诱剂的方向并向它运动的。(见 4.16 节)

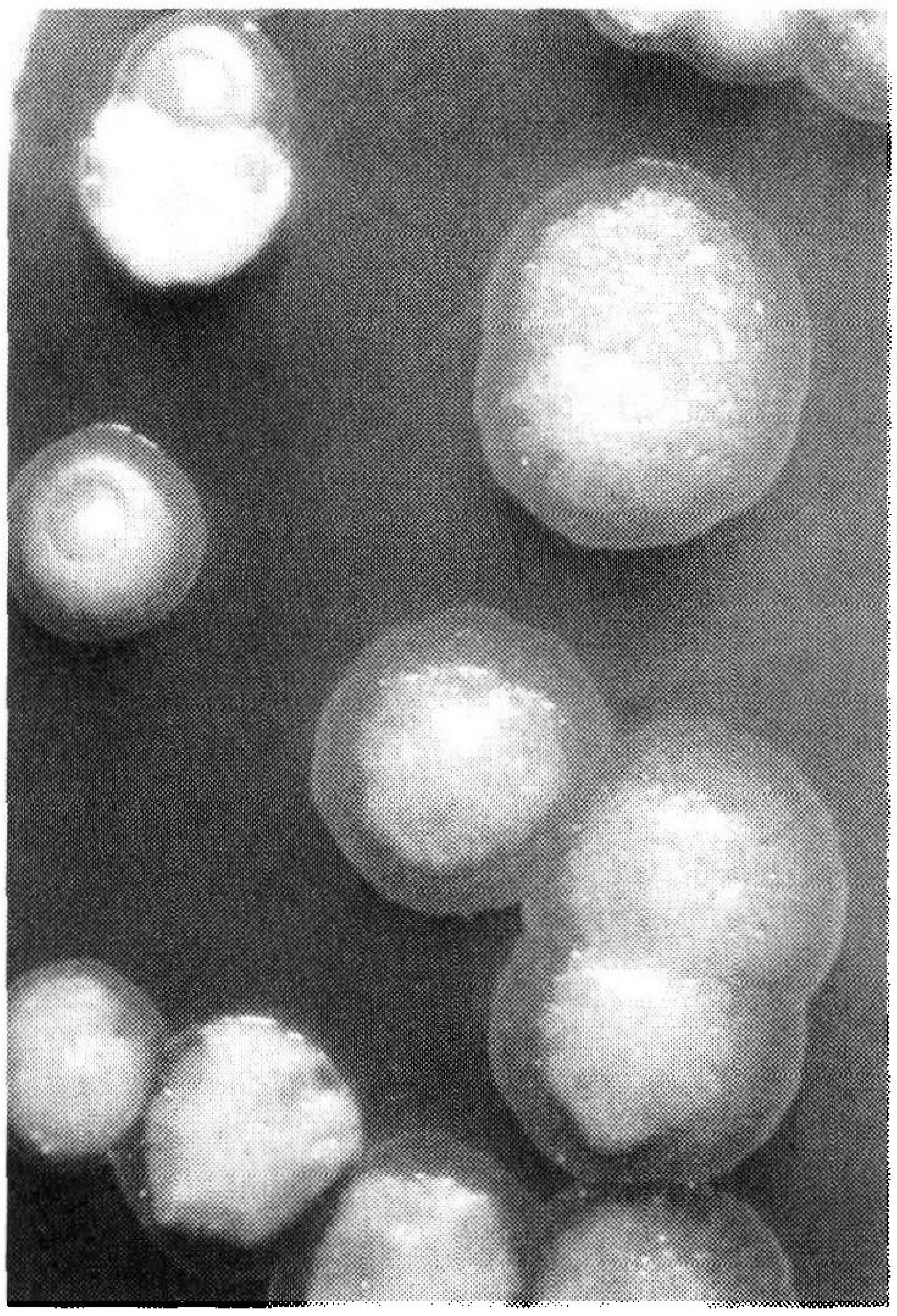
应用题

1. 计算用数值孔径为 1.32 的 100×油镜在 600nm 光线下观察样品的最小分辨率是多少？用同样的镜头如何提高分辨率？
2. 计算直径为 15μm 和 2μm 的球形细胞的表面积与体积之比，二者的差别说明了什么？
3. 假设给你两种培养物，一种是革兰氏阴性菌，一种是古生菌，除了测序 rRNA 外（见 2.3 节），讨论至少 4 种鉴别两种培养物的方法。
4. 计算大肠杆菌细胞（1μm×3μm）以最大速度游过含有化学引诱剂的 3cm 长毛细管所花费的时间。

（李明春　译，严　冰　校）

5

微生物营养、实验室培养和代谢



在实验室中培养微生物及理解微生物细胞在自然栖息地中的生命活动需要我们对微生物营养和生物能学有所了解。

词汇表

活化能（activation energy）：使底物达到反应状态所需的能量

合成代谢（anabolism）：细胞内所进行的全部生物合成反应

无菌操作技术（aseptic technique）：在整个操作过程中使培养基及其他无菌物体保持无菌的方法

ATP 合成酶（ATP synthase）：一种镶嵌在细胞质膜上的多蛋白酶复合体，能将 ATP 的合成与质子动力的消耗偶联起来

自养生物（autotroph）：能够以 CO_2 作为唯一碳源合成自身所需原料的生物

分解代谢（catabolism）：细胞内能够产生能量的（一般是 ATP）反应

催化剂（catalyst）：一类能加速化学反应而自身在反应过程中不被消耗的物质

化学渗透（chemiosmosis）：将 ATP 合成与质子动力的消耗偶联起来的过程

柠檬酸循环（citric acid cycle）：经过一系列循环反应，最终能使乙酸转化成两分子 CO_2

辅酶（coenzyme）：一类非蛋白成分的小分子，可以作为酶的一部分参与催化反应

复合培养基（complex medium）：由化学成分不确定的物质（如酵母膏和牛肉浸膏）所组成的培养基

培养基（culture medium）：能溶于水且适合于微生物生长的许多营养物质

合成培养基（defined medium）：已知其精确的化学成分的培养基

电子受体（electron acceptor）：反应过程中能从其他物质得到电子，从而处于还原状态的物质

电子供体（electron donor）：在反应过程中能提供电子给受体，从而处于氧化状态的物质

吸能（endergonic）：需要能量

放能（exergonic）：释放能量

发酵（fermentation）：一种厌氧分解代谢。在这个过程中有机化合物既作为电子受体又作为电子供体进行底物水平磷酸化，并且产生 ATP

自由能（free energy，*G*）：能用来做功的能量 $G^{0\prime}$ 是标准状态下的自由能

糖酵解（glycolysis）：将葡萄糖发酵产生 ATP 和各种发酵产物的过程也叫做糖酵解途径（Embden-Meyerhof pathway，EMP）

氧化磷酸化（oxidative phosphorylation）：通过消耗由电子传递所形成的质子动力产生 ATP 的过程

光合磷酸化（photophosphorylation）：通过消耗光推动的电子转递产生的质子动力产生 ATP 的过程

质子动力（proton motive force）：跨膜时由于电荷和水的成分（H^+ 和 OH^-）分离而使膜处于能化的状态

纯培养（pure culture）：只含有一种微生物的培养物

还原电势（reduction potential）：化合物提供电子的内在倾向能力，$E_0{}'$是标准状态下的还原电位

呼吸作用（respiration）：在 O_2 存在的情况下化合物被氧化的过程，O_2 作为终端电子受体，通常还伴随着氧化磷酸化产生 ATP

铁载体（siderophore）：一种能在很低浓度下与铁结合的螯合剂

底物水平磷酸化（substrate-level phosphorylation）：直接从磷酸化的有机化合物传递一个高能量的磷酸分子给 ADP，而产生 ATP 的过程

Ⅰ 微生物的营养和培养

在一个细胞开始复制之前，它必须有能力控制各种化学反应，组织各种分子形成特殊结构。代谢这个术语习惯上是指发生在细胞内的所有化学反应。生物体最终的表现就是自身的复制（生长）。这一章我们着重讲述代谢，下一章讨论细胞的实际生长过程。一个有生命的体系关键的特征就是有能力控制各种化学反应，组织各分子形成特殊结构。总的来讲我们将这些反应叫做新陈代谢（metabolism）。代谢反应要么是放能反应，也叫分解反应或分解代谢（catabolic reaction，catabolism）或需能反应（energy requiring），又叫做合成反应或合成代谢（anabolic reaction，anabolism）。细胞中发生着各种不同的合成和分解代谢反应，将在本章和接下来的章节中讨论一些关键反应。

然而，在讨论这些问题之前，必须要讨论一下微生物是如何在实验室中生长的。我们所熟知的大多数关于微生物代谢的活动的知识都来源于对培养的微生物的研究。在此将集中讨论以有机物作为碳源和能量来源的化能有机营养菌（chemoorganotroph）（见 2.4 节）。本章后面的部分将讨论能量产生的机制而不是化能有机营养。采用这些能量产生机制的微生物也可在实验室中进行培养，更多关于营养和细胞培养的规律同样适用于这些微生物。

5.1 微生物营养

从第三章的内容我们知道细胞主要包括大分子物质和水，大分子物质是小分子物质的多聚体，这些小单位叫做单体（monomer）（见 3.2 节）。微生物营养是微生物生理的一部分，主要涉及微生物生长所需的单体（或者单体的前体物）。总的来讲，这些所需的物质叫做营养（nutrient）。

不同有机体以这种或者那种特定的方式需要不同种类的营养。所需的营养物质的量各不相同。一些常量营养物质（macronutrient）需求量很大（表 5.1），而另外一些微量营养物质（micronutrient）需求量要小一些，有时只需要痕量即可。我们从主要的常量营养物碳（carbon）和氮（nitrogen）开始。

碳源和氮源

所有的细胞都需要碳源，某些原核生物需要某些种类的有机化合物作为它们的碳源。一般碳源约占细胞干重的 50%，碳源是所有大分子物质中的主要成分。细菌可以同化不同的有机碳化合物，并利用它们制造新的细胞物质。氨基酸、脂肪酸、有机酸、糖、氮源、芳香类化合物和很多不计其数的其他有机化合物都可以被细菌利用。相反，有一些自养型的原核生物可以利用二氧化碳来组建各种结构。这个过程中所需的能量来源于光能或者无机化合物。

碳源之后第二个大量存在的成分是氮源。一般氮源占整个细胞干重的 12%，氮源对于蛋白质、核酸和一些其他成分的合成非常重要。自然界中的氮源以有机物和无机物的形式存在（表 5.1）。然而，大量可用的氮源是以无机物的形式存在，如氨气、硝酸

盐和氮气。大多数细菌能以氨作为唯一的氮源，还有很多细菌可以利用硝酸盐作为唯一氮源。而氮气则只能被某些细菌［如固氮细菌（nitrogen-fixing bacteria)］作为氮源，会在后面讨论这些有机体的特点（见 12.9 节、17.28 节和 19.12 节)。

表 5.1　自然界和培养基中存在的常量营养物

元素	环境中营养物所存在的一般形式	培养基中所提供的化学形式
C	CO_2、有机化合物	葡萄糖、麦芽糖、乙酸、丙酮酸、氨基酸、几百种其他化合物或者复杂的混合物(酵母抽提物、蛋白胨等)
H	H_2O、有机化合物	H_2O、有机化合物
O	H_2O、O_2有机化合物	H_2O、有机化合物
N	NH_3、NO_3^-、N_2、有机含氮化合物	无机氮：NH_4Cl、$(NH_4)_2SO_4$、KNO_3、N_2 有机氮：氨基酸、核苷酸上的碱基、其他许多含氮的有机物
P	PO_4^{3-}	KH_2PO_4、Na_2PO_4
S	H_2S、SO_4^{2-}、有机硫化物、金属硫化物(FeS、CuS、ZnS、NiS 等)	Na_2SO_4、$Na_2S_2O_3$、Na_2S、半胱氨酸和其他有机硫化合物
K	溶液中 K^+或多种钾盐	KCl、KH_2PO_4
Mg	溶液中的镁离子和各种镁盐	$MgSO_4$、$MgCl_2$
Na	溶液中的 Na^+，或者 NaCl 或其他 Na 盐	NaCl
Ca	溶液中的 Ca^{2+}或者 $CaSO_4$或者其他 Ca 盐	$CaCl_2$
Fe	溶液中的 Fe^{2+} 或者 Fe^{3+} 或者作为 FeS、$Fe(OH)_3$和许多其他的 Fe 盐	$FeCl_3$、$FeSO_4$、各种螯合铁溶液(Fe^{3+} EDTA，Fe^{3+} 柠檬酸等)

其他常量营养物：P、S、K、Mg、Ca、Na

磷元素（phosphorus）在自然界中既能以无机磷形式存在，也能以有机磷的形式存在，细胞内磷元素主要用于核酸及磷脂的合成。生物体需要硫元素是由于硫元素可构成半胱氨酸和甲硫氨酸的骨架结构（见 3.6 节)，且维生素 B_1、生物素、硫辛酸及辅酶 A 等许多维生素中都含有硫元素。硫元素可以以不同的形式被有机体利用，在自然界中经历了很多化学转化。这些转化过程很多都只发生在微生物中（见 19.13 节)。细胞中的硫多是以 SO_4^{2-} 或 HS^- 等无机离子形式得到（表 5.1)。所有的生物体都需要钾（K)。许多种酶，包括一些蛋白质合成中所需要的酶都专一性地需要钾的存在。镁（Mg）的功能主要是稳定核糖体、细胞膜、核酸及维持许多酶的活性。钙（Ca)（对许多微生物生长而言并不是一种必需的营养物质）有助于加固细菌的细胞壁及增加内生孢子的抗热稳定性（见 3.13 节)。钠（Na）元素只是一些微生物需要，对钠的需求一般都能反映出生物体所处的生活环境。例如，海水含有高含量的盐，海洋生物生长一般都需要钠。反之，靠近淡水区域的生物体一般都不需要钠。

铁

呼吸作用中铁起重要作用，因为线粒体的电子传递链中 Fe-S 蛋白是一个极为关键的成分（见 5.11 节和表 5.2)。无氧条件下，铁一般是以可溶性 Fe^{2+}形式存在。而在有氧条件下，通常是以 Fe^{3+}的形式存在，且形成了各种不溶物质。要从这些不溶物质获得铁，细胞必须要产生一些叫做铁载体的物质，它能结合铁并且将它们运输到细胞中。

铁载体中异羟肟酸衍生物是一种重要组分，此衍生物可以紧紧螯合 Fe^{3+} （图 5.1a）。一旦螯合 Fe^{3+} 的异羟肟酸复合物进入到细胞内，就能释放出 Fe^{3+}，再将异羟肟酸分泌到细胞外重新运输 Fe^{3+}。

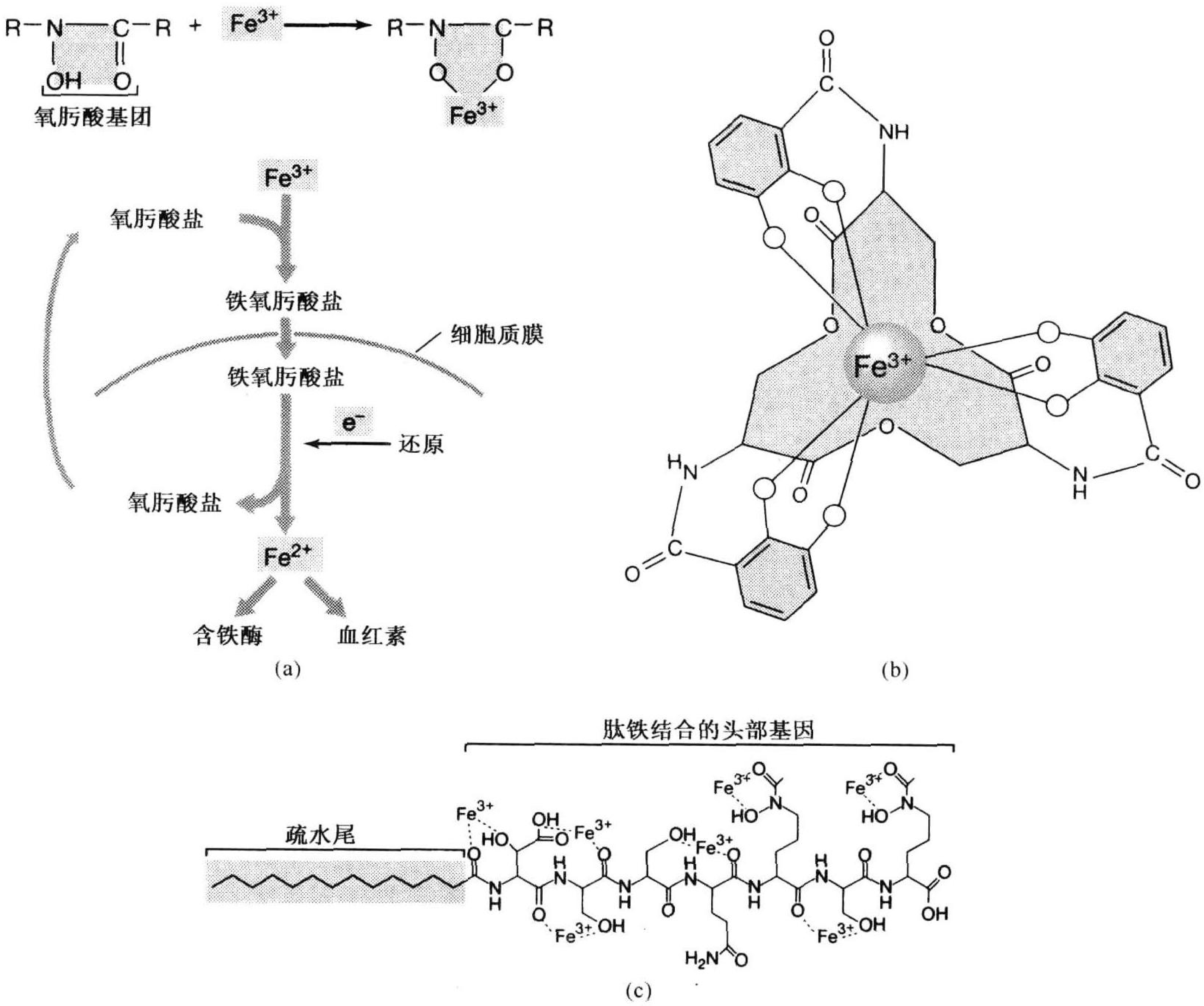


图 5.1 微生物产生的铁螯合剂。(a) 氧肟酸盐，铁离子以 Fe^{3+} 的形式结合并以 Fe^{2+} 的形式释放到细胞中，然后氧肟酸盐离开细胞开始新的循环。(b) 大肠杆菌的铁肠杆菌素。用黄色表示出了邻苯二酚上的每个氧原子。(c) 多肽形式和带尾部的铁载体 aquachelin，表示出了 Fe^{3+} 的结合。疏水性的尾巴 aquachelin 形成线形并通过细胞膜进入到细胞中。

某些肠道细菌，如大肠杆菌（*Escherichia coli*）和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*），可以产生含苯环的复杂铁传递蛋白，这种铁传递蛋白被命名为肠杆菌素。一些铁传递蛋白是芳香族化合物儿茶酚的衍生物，它可以紧紧束缚 Fe^{3+}。如果没有这些物质，很多病原菌都无法开始它们的侵染过程。动物体组织中铁的供给很少，因为铁吸收系统可以结合铁使微生物无法利用铁离子。

海水中检测不到铁离子的存在，因为表面海水中每毫升只含有皮克（pg）级铁。为了消除此因素带来的不利之处，很多海洋细菌产生了非常复杂的铁载体，这种载体能在很小的浓度范围内将铁隔离开。这些载体利用一个肽的头部结合铁，还有一个脂类的尾巴与原生质膜结合。一旦这些化合物（如 aquachelin）结合了铁，它们就会聚集在类脂小体中并转运到细胞中。

一些原核生物可以在完全没有铁的环境中生长，如乳酸杆菌属 *Lactrobacillus plantarum* 和疏螺旋体属 *Borrelia burgdorferri*（后者是引起淋巴病的致病因子）都不含有铁。这些细菌中，Mn^{2+} 代替了 Fe^{2+} 作为酶的金属成分。

微量营养物（痕量成分）

虽然细胞对微量营养物需求量很少，但对细胞的功能来说，微量营养物与常量营养物是同样重要的。就如同铁元素一样，微量营养物都是金属元素，因此也经常叫做痕量成分（trace element）。许多金属元素在很多酶的催化过程中起着重要的作用。表 5.2 总结了生物体中主要的微量营养物及它们在各种酶中所起的作用。

表 5.2　生命有机体中所需的微量营养物[a]

元素	细胞功能
B	存在于细菌密度感应的自体诱导物中，在一些多肽抗生素中也有发现
Cr	动物的糖代谢所需。在微生物中不需要
Co	维生素 B_{12}；羧基转移酶(丙酸菌)
Cu	呼吸、细胞色素 c 氧化酶、光合作用、质体蓝素和一些超氧化物歧化酶
Fe[b]	色素、过氧化物酶、过氧化氢酶、铁硫蛋白、加氧酶和所有固氮酶
Mn	许多酶的激活剂，存在于某些过氧化物歧化酶中和产氧气的光营养的水裂解酶中
Mo	某些含有黄素的酶、一些固氮酶、硝酸还原酶、亚硫酸盐氧化酶、DMSO-TMAO 还原酶和一些甲酸盐脱氢酶
Ni	大多数的氢化酶、产甲烷的辅酶 F_{430}、一氧化碳脱氢酶和尿素酶
Se	甲酸脱氢酶、一些氢化酶、氨基酸-硒代半胱氨酸
W	一些甲酸盐脱氢酶、极端嗜热菌的氧转移酶
V	钒固氮酶、溴代过氧化物酶
Zn	碳脱水酶、乙醇脱氢酶、RNA 和 DNA 聚合酶及许多 DNA 结合蛋白

a. 并非所有列出的微量元素都是细胞所需要的。有些列出的金属元素只在特定的微生物酶中发现。

b. 大量而不是微量需求。

实验室条件下培养微生物，对微量元素的需求非常少，所以无需在培养基中添加微量元素。但是，如果培养基是由高纯度的化合物溶于高纯度的蒸馏水配制而成，则会出现微量元素的缺乏。在这种情况下，就需要在培养基中添加少量的微量元素（表 5.2）以满足微生物对金属元素的需求。

生长因子

生长因子与微量营养物一样是有机化合物，需求量非常少，并且只有某些细胞需要。生长因子包括维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶等。虽然许多微生物能够合成所有这些化合物，但有些微生物却要从环境中得到其中一种或多种生长因子，因此在实验室培养过程中必须添加这些化合物。

维生素是最普遍的生长因子。有很多维生素是辅酶的一部分（图 5.10、图 5.12 和图 5.15），表 5.3 中总结了这些含维生素的辅酶。微生物对维生素的需求各不相同，有的一种都不需要，有的需要很多种。乳酸菌包括链球菌属（*Streptococcus*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）、明串球菌属（*Leuconostoc*）或其他属（见 12.19 节），都是众所周知的需要复杂维生素的细菌，有些甚至比人需要的维生素还多（表 5.4）。微生物所需要的最普遍的维生素包括硫胺素（维生素 B_1）、生物素、吡哆胺（维生素 B_6）和钴胺素（维生素 B_{12}）。

表 5.3 生长因子：维生素和它们的功能

维生素	功能
p-氨基苯甲酸	叶酸的前体
叶酸	一碳代谢、甲基转移
维生素 H	脂肪酸合成、β-脱羧、一些 CO_2 固定反应
维生素 B_{12}	一碳单位的转移和还原、脱氧核糖的合成
硫辛酸	丙酮酸和 α-酮戊二酸脱羧反应中酰基的转移
尼克酸	NAD^+ 的前体(图 5.10)、氧化还原反应中电子的传递
泛酸	辅酶 A 的前体、乙酰基和其他酰基衍生物的活化
黄素	FMN 的前体(图 5.15)、与电子传递有关的黄素蛋白中的 FAD
维生素 B_1	α-脱羧、转酮醇酶
维生素 B_6	氨基酸和酮酸的转化
K 组，喹宁	电子传递、神经鞘脂的合成
氧肟酸盐(载铁物质)	铁结合化合物、铁的溶解和转运到细胞

表 5.4 含有简单而必须营养元素的微生物培养基举例[a]

大肠杆菌(*E. coli*)的合成培养基	肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)合成培养基	大肠杆菌和肠膜状明串珠菌的复合培养基
K_2HPO_4 7g KH_2PO_4 2g $(NH4)_2SO_4$ 1g $MgSO_4$ 0.1g $CaCl_2$ 0.02g 葡萄糖 4～10g 微量元素(Fe、Mn、Zn、Cu、Ni、Mo)各2～10μg 蒸馏水 1000ml pH 7	K_2HPO_4 0.6g KH_2PO_4 0.6g NH_4Cl 3g $MgSO_4$ 0.1g 葡萄糖 25g 乙酸钠 20g 氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸)每种 100～200μg 嘌呤和嘧啶(腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶)每一种 10mg 维生素(生物素、叶酸、尼克酸、吡哆醛、吡哆胺、吡哆醇、核黄素、硫胺素、泛酸、对氨基苯甲酸)每一种 0.01～1mg 微量元素(见第一列)每一种 2～10μg 蒸馏水 1000ml pH 7	葡萄糖 15g 酵母提取物 5g 蛋白胨 5g K_2HPO_4 0.6g 蒸馏水 1000ml pH 7

a. 试管的照片为合成培养基(a)和复合培养基(b)。注意合成培养基的颜色来自于所包含的几种有机抽提物和消化物。照片经过卡本代尔南伊利诺伊大学的 Chery L. Broadie 和 John Vercillo 允许。

概念检查

存在于活细胞中的几百种化合物的形成起始于营养物质。其中大量需求的部分叫做常量营养物，而一些需求量很少的元素，如金属元素和一些有机化合物，就被分别称之为微量元素和生长因子。

◆ 细胞中的哪两种大分子含有大量的氮？

◆ 为什么像 Co^{2+} 这样的元素被认为是微量元素，而像 C 这样的元素却是常量营养物？

◆ 铁在细胞代谢中起什么作用？细胞如何隔离铁？

5.2 培养基

培养基（culture media）是实验室中用来培养微生物的营养液。因为详细地的研究微生物需要实验室培养，因此在选择和配置培养基时要多注意。

培养基的种类

在微生物学中，培养基可以大体分为两大类，即化学成分确知的培养基和化学成分不确知的培养基（复合培养基）。化学成分确知培养基（chemically defined medium）简称合成培养基（defined medium），是把各种精确称量的高纯度的有机和无机化合物溶于蒸馏水中制成的。因此，这种培养基的化学成分是已知的。在任何培养基中起同等重要作用的是碳源，因为所有细胞都需要大量的碳源产生新的细胞物质。在一种简单的成分已知的培养基中存在着单一的碳源。碳源的性质和浓度根据培养的微生物的不同而不同。

然而在很多情况下，培养基的确切组成并不是非常重要。在这些情况下，复合培养基或许就能够满足微生物的需求，或在某些情况下复合培养基更为方便。复合培养基（complex medium）可能含有酪素、牛肉膏、大豆粉、酵母细胞或任何一种高营养的营养物质（化学成分不明确）的水解液。这种水解液在市场上可以买到粉末状的商品，既可快速称量，又易溶于水。但是，使用这种复合培养基不能控制它的确切营养成分。

在一些特殊的情况下尤其是对于临床微生物，培养基经常被制作成选择性的或者有差别的（或者二者都有）。选择性培养基（selective medium）含有选择性抑制某些微生物而不抑制其他微生物生长的物质。与此相比，差别培养基是一种含有指示剂（通常为染料）的培养基，这种培养基能使人们区分开微生物生长过程中发生的一些特定的化学反应。差别培养基在区分细菌不同种的过程中非常有用，这些细菌中的一些种类能发生特定的反应，而另外一些则不能。将在第 24 章中进一步讨论差别和选择性培养基。

营养需求及生物合成能力

表 5.4 列出了 3 种培养基的配制方法，其中两种培养基的营养成分是确切的，另一种是复合培养基。复合培养基容易配制，且可以满足表中任何一种微生物的正常生长，如肠道菌大肠杆菌（*E. coli*）、乳酸细菌肠膜状明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）及那些对营养要求非常苛刻的细菌。组成成分简单明确的培养基能够很好地维持大肠杆菌的生长，但却不能够维持肠膜状明串珠菌的生长。肠膜状明串珠菌要在营养成分确切的培养基中生长，需要加入几种大肠杆菌生长所不需要的有机营养物和生长因子（表 5.4）。从这一点考虑，大肠杆菌和肠膜状明串珠菌到底哪一种微生物具有更强的生物合成能力呢？显而易见，既然大肠杆菌能在营养成分确切且较为简单的培养基上生长，就

意味着大肠杆菌能够在葡萄糖存在的情况下，有能力由单一的碳源合成细胞组成所需要的所有有机物。相比之下，肠膜状明串珠菌需要大量的生长因子，这说明它的生物合成能力是有限的。若要满足肠膜状明串珠菌所需的复杂营养需求，要么提供给它表 5.4 所列出的成分确切的培养基（这种培养基需消耗大量时间去准备），要么使用复合培养基，这种培养基可很快地准备完毕。

一些病原微生物对营养物质的需求比肠膜状明串珠菌还要严格。要培养这些微生物就需要富集培养基（enriched medium）。富集培养基是以复合培养基为基础，在复合培养基中加入另外的营养物质（如牛血清或者全血）构成。加入的这些营养物质能很好地模拟宿主体内的环境，对于成功地培养某些微生物［如酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）和淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）等］是必需的。

从表 5.4 得出的一个主要结论是，不同的微生物对营养要求有很大的差别，明确这一点非常重要。因此，为了成功地培养一种已知的微生物，了解它的营养要求，且以适当的方式和营养比例配制培养基，满足它必需的营养成分是极为重要的。如果在配制培养基的过程中注意到这些方面，在实验室中培养各种不同的微生物是很容易的。现在就来讨论一下培养微生物的过程。

概念检查

培养基提供了微生物所需的营养，培养基可以是化学成分已知的也可以是未知的。选择性、差别和富集培养基是用来描述那些用来分离特定种属和对微生物进行比较研究的培养基的术语。

◆ 为什么在复合培养基中培养肠膜状明串珠菌要比在合成培养基中容易？

◆ 你认为大肠杆菌在复合培养基中生长的快还是在化学合成培养基中生长的快？为什么？

5.3 微生物的实验室培养

一旦制备好了一种培养基并且进行了灭菌，就可以将微生物接种到培养基中并且在合适的条件下培养。实验室条件下，接种的通常是纯培养（pure culture），这种培养物只含有一种微生物。

防止其他微生物进入到纯培养中是非常必要的，这些不需要的有机体（也叫做污染物）是无处不在的（正如巴斯德在一百多年以前发现的那样），微生物技术就是为了避免这些污染物。获得纯培养并对这些纯培养进行纯度评估的一个主要方法是使用在培养皿中制备的一种特定的固体培养基。现在就来看一下固体培养基。

固体和液体培养基

有时通过在液体培养基中加入凝胶物质制备成半固体培养基，这种固体培养基可以固定细胞，使它们生长并形成可见的各自分离的群体，叫做菌落（colony）（图 5.2）。细菌菌落具有不同的形状和大小，这些决定于不同的微生物、培养条件、提供的不同营

养（包括氧气的数量）及一些其他的生理参数。有些细菌可以产生色素，使菌落呈现出各种不同的颜色（图 5.2），菌落使得微生物学家能看到培养的纯度。含有多于一种菌落形态的平板表明培养物受到污染。采用平板法检测培养物的纯度已经有 100 年的历史（见 1.6 节）。

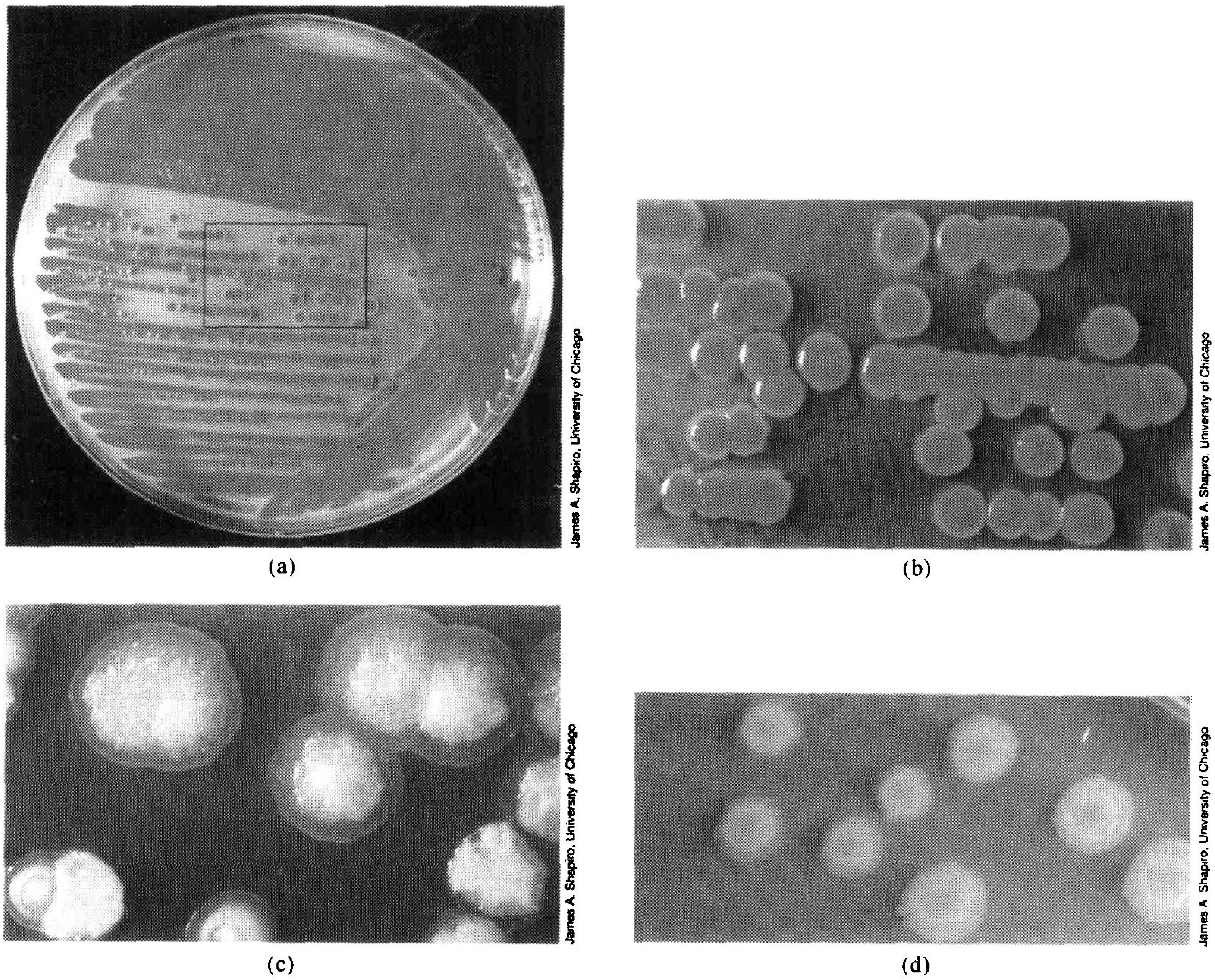


图 5.2　细菌菌落举例。菌落是一些可见的细胞群体，通过一个或者几个细胞分裂形成。菌落的大小、形态和颜色是这种细菌的参数。一个菌落中的细胞数变化很大，这取决于菌落的大小和细胞在菌落中的排列。含有超过十亿个细胞的菌落并不多见。（a）生长在 MacConkey 培养基上的黏质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）。（b）图 a 中的画出的菌落的放大。（c）生长在大豆酪蛋白胰酶水解物培养基上的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。（d）生长在 MacConkey 培养基上的弗氏志贺（氏）菌（*Shigella flexneri*）。

除了在灭菌之前以 1.5%的比例加入琼脂作为胶化剂之外，固体培养基和液体培养基的制备方法是相同的。琼脂在灭菌的过程中熔化，然后将熔化的琼脂倒入到灭菌的玻璃平皿或者塑料平皿中使之在接种之前凝固（图 5.2）。

无菌技术

微生物无处不在，因此培养基在使用之前必须灭菌。对于大多数的培养基而言，是通过在称作高压灭菌锅（autoclave）中的高压湿热灭菌实现的。将在后面讨论高压灭菌锅的操作和原理及其他的灭菌方法（见 20.1 节）。

一旦准备好了灭菌的培养基，就可以将以前的纯培养物接种到培养基中使它重新开始生长。这种操作需要无菌技术（aseptic technique），它是一系列用来防止污染的步骤（图 5.3 和图 5.4）。在微生物实验室中要取得成功，掌握无菌技术是必需的。它是新的微生物研究者首先要掌握的方法。空气传播的污染物是最常见的问题，因为实验室空气中的微尘含有微生物菌落。容器打开的时候必须采用某种方式使满载污染物的空气无法进入到器皿中（图 5.3 和图 5.4）。

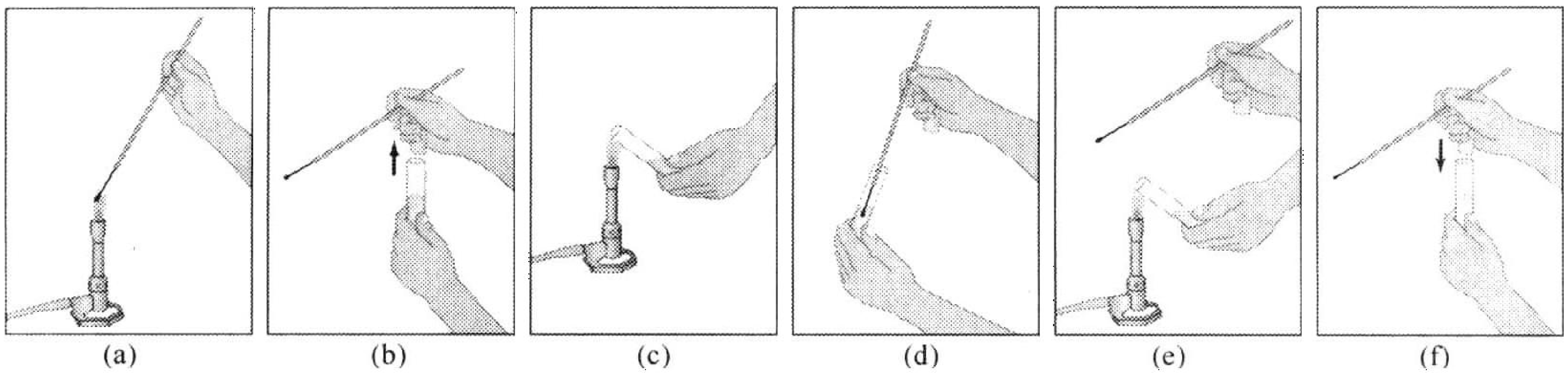


图 5.3 无菌接种。(a) 将接种环烧红并在空气中冷却。(b) 将试管的盖子打开。(c) 试管的头部通过火焰。(d) 用灭菌环将样品移出。(e) 在无菌环上转移样品，再次将试管头通过火焰，将样品接种到无菌培养基中。(f) 将盖子盖好。将接种针收起来之前再次烧灼接种环。

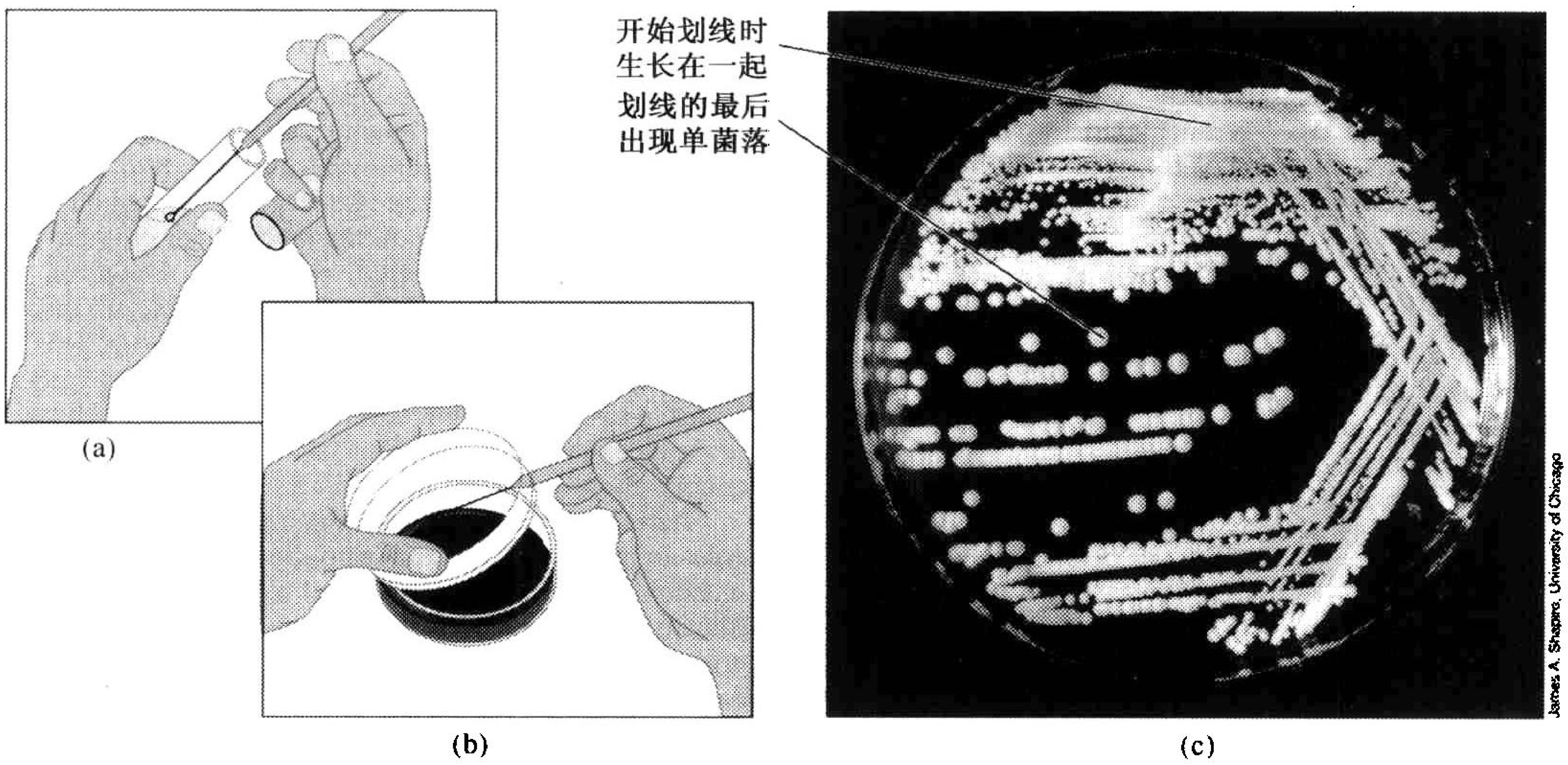


图 5.4 划线获得纯培养的方法。(a) 将接种环灭菌并从试管中移出一环接种物。(b) 在灭菌的琼脂平板上划线使菌体铺开。第一次划线后与之形成一定的角度再次划线。两次划线之间接种环要进行灭菌。(c) 接种后出现的好的划线平板。在血琼脂平板上长出了藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）菌落。可以通过分离的单菌落获得纯培养。

将培养物从一管培养基中无菌转接到另外一管培养基中通常是通过灼烧灭菌的环或者针完成（图 5.3）。液体培养的细胞也可以转移到琼脂平板的表面（图 5.4），菌落可以通过单个细胞的分裂和生长形成。从单菌落挑取并重新划线是从含有多种不同微生物的群体中获得纯培养的主要方法。

概念检查

微生物可以在含有它们生长所需的培养基上生长。微生物纯培养物的培养和保存只有通过无菌技术才能获得。

◆ 无菌是什么意思？如果刚刚配制的培养基放在常温下没有灭菌会出现什么情况？

◆ 为什么无菌技术对于在实验室中培养纯培养物是必需的？

Ⅱ 能学和酶

在第二章已经学到了微生物所利用的不同种类的能量——有机化能营养、无机化能营养和光能营养（见 2.4 节）。不管有机体如何生活，它必须能将所获得的能量以 ATP 的形式储存起来。在此，将用一些简单的化学和物理定理来帮助我们讨论能量储存的法则。然后会考虑一下细胞的催化剂——酶。

5.4 生物能学

能（energy）被定义为能够做功的能力。微生物学中使用千焦耳（kJ）作为计量单位。化学反应伴随着能量的转换。尽管任何化学反应都有部分的能量以热的形式损失，在微生物学中我们感兴趣的是自由能（free energy）（简写为 *G*）。常用来表示可获得的用来做有用功的那部分能量。反应中的自由能变化用$\triangle G^{0\prime}$表示，△代表变化。上标表示自由能的数值是在标准情况 pH 7、25℃和一个大气压下获得的，所有反应物和产物浓度都是 1mol/L。在下面这个反应中：

$$A+B \rightarrow C+D$$

如果$\triangle G^{0\prime}$是负值，就释放出自由能，反应会自发地按所示的方向进行，这种反应叫放能反应（exergonic），放出的能量会以 ATP 的形式储存起来。如果相反，$\triangle G^{0\prime}$是正值，这个反应需要能量才能进行，这种反应叫吸能反应（endergonic）。因此，从微生物细胞的角度上讲，放能反应释放能量而吸能反应需要能量。

自由能的形成和$\triangle G^{0\prime}$的计算

要计算一个反应的自由能，就必须知道反应物和产物的自由能。自由能的形成（G_f^0）是指在元素形成特定分子的过程中释放和需要的能量。表 5.5 有一些 G_f^0 的例子。通常，形成单质的自由能为 0，而形成化合物的 G_f^0不是 0。如果由元素生成化合物是释放能量的过程，那么形成这个化合物的自由能就是负值（释放能量），如果这个反应是需能的，则生成这个化合物的自由能是正值（需要能量）。

大多数多化合物的 G_f^0是负值，反映了化合物都倾向于由各元素自发生成。对于具有正 G_f^0的氧化亚氮（+104.2kJ/mol，表 5.5）而言，这种分子不会自发形成，反而会自发地降解成氮气和氧气。微生物有关的一些化合物的自由能在附录 1 中给出。

表 5.5 与微生物学有关的几种化合物的自由能形成

化合物	形成的自由能[a]
H_2O	−237.2
CO_2	−394.4
H_2	0
O_2	0
NH_4^-	−79.4
N_2O	+104.2
$C_2H_3O_2^-$	−369.4
$C_6H_{12}O_6$	−917.3
CH_4	−50.8
CH_3OH	−175.4

a. 形成的自由能的数值是G_f^0用 kJ/mol 表示。表 A1.1 中列出了更为详细的自由能的形成。

利用生成的自由能可以计算一个反应的自由能变化。例如，一个简单反应：A+B→C+D、$\Delta G^{0\prime}$就等于产物（C 和 D）的生成自由能减去反应物（A 和 B）的生成自由能，因此：

$$\Delta G^{0\prime}=G_f^0\ [C+D]-G_f^0\ [A+B]$$

这里所指的"产物减反应物"总结出了计算一个化学反应中自由能的变化所必须具备的步骤。但是，在计算自由能之前，必须使反应达到化学平衡。附录 1 详细描述了计算任何给定反应自由能的步骤。

$G^{0\prime}$与 ΔG 的比较

在标准条件计算的自由能只是自然条件下自由能变化的近似值。尽管计算 $G^{0\prime}$的通常能对真实自由能的变化进行很好的评估，但在某些条件下并非如此。在本书的后面部分发现，实际反应中产物和反应物的浓度通常很少在 1mol/L 水平，这种浓度变化会改变反应的生物能，有时改变的还很多（见 17.21 节、19.10 节和附录 1）。因此，对于生物能的计算而言，重要的不是 $G^{0\prime}$而是 ΔG，是在微生物的真实生活条件下的自由能变化。ΔG 是自由能的一种形式，它将反应物和产物的真实浓度考虑在其中，用下面公式表示：

$$\Delta G=G^{0\prime}+RT\ \ln K$$

式中，R 和 T 是物理常数，K 是反应的平衡常数（附录 1）。在第 17 章中将再次对 $\Delta G^{0\prime}$与 ΔG 之间的差别进行讨论，在那一章中还会对代谢多样性进行讨论。现在集中来看一下 $\Delta G^{0\prime}$在微生物催化的化学反应中能告诉我们哪些内容。

概念检查

细胞的化学反应伴随着能量的变化，用 kJ 表示。化学反应中伴随着能量的释放和消耗。

◆ 什么是自由能？

◆ 一般分解反应是放能还是需能？

◆ 用表 5.5 中的数据计算下面反应的 $\Delta G^{0\prime}$：$CH_4+O_2\rightarrow CH_3OH$？如何区分 $\Delta G^{0\prime}$和 ΔG？

5.5 催化和酶

计算自由能只能告诉我们反应是放能和需能，并没有告诉反应的速率。H_2和 O_2生成水是一个很好的例子：$H_2+1/2O_2 \rightarrow H_2O$，$G^{0\prime}=-237kJ$。但在日常生活中，若只简单地把 H_2和 O_2混合并不能检测到水的生成。可以这样解释此现象，氢原子和氧原子重新组合成水，首先需要反应物化合键的断裂，而化合键的断裂就需要能量，这种能量就是指使一个化学反应中所有分子达到反应状态所需要的能量叫做活化能（activation energy）。

活化能是使化学反应中所有分子达到活化状态的能量。图 5.5 对这种纯粹放能的反应进行了表述。尽管在没有催化剂的情况下活化能的障碍是无法逾越的，但在合适的催化剂存在的条件下，这种障碍会相对容易越过（图 5.5）。

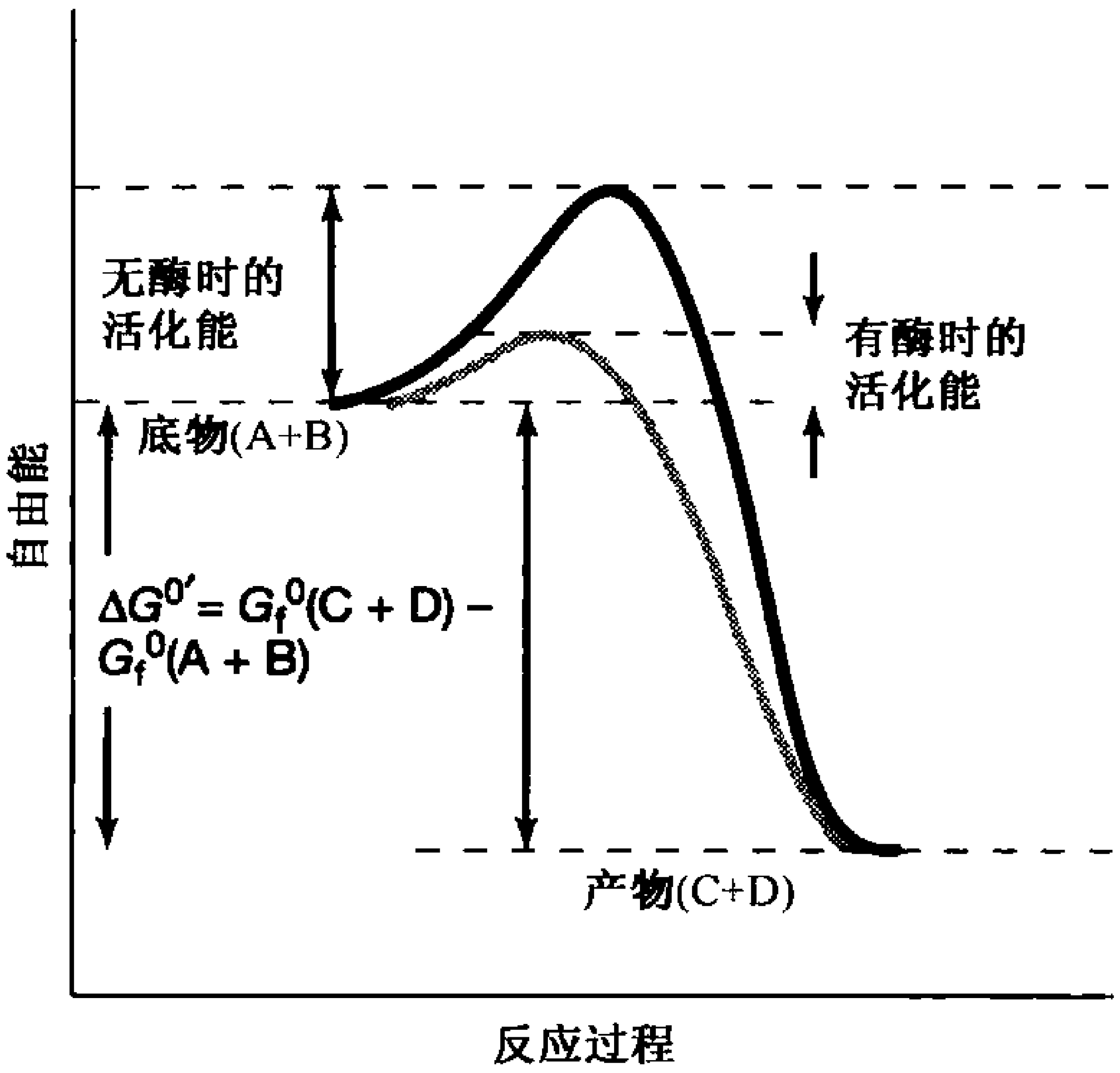


图 5.5 一个假设的反应步骤：A+B→C+D 和活化能概念。即使是释放能量的化学反应也不会自发进行，因为反应物首先必须被活化，一旦处于活化状态，反应就会自发进行。催化剂（如酶）可以降低反应所需要的活化能。

酶

活化能使我们想到了酶和催化作用。从生物化学的意义上讲，催化剂（catalyst）是指能够降低一个反应活化能的物质。催化剂能够加快反应速度，但自身并没有发生变化。需要注意的是催化剂并不会影响反应的平衡状态和产生的能量，它只会影响正在进行的反应的速度。

生物体内发生的许多反应在没有催化作用的前提下是不会以相当快的速度进行的。生物催化剂是被称为酶的蛋白质。酶对它们所催化的反应是高效专一的。也就是说，每一种酶只能催化一种类型的化学反应，或者在某些情况下，酶只能催化一类相似的反应。酶的专一性与酶分子精确的三维空间结构有关。在一个酶催化的反应中，酶只是暂时与反应物结合，生成一个酶-底物复合体，反应物被称为是酶的底物（S）。随着反应的进行生成产物（P），酶（E）就恢复成它原来的状态：

$$E+S \longleftrightarrow E\text{-}S \longleftrightarrow E+P$$

一般情况下酶比底物（S）大得多。酶与底物是以很微弱的键（如氢键、范德华力或疏水作用）（见 3.1 节）相结合。酶结合底物的位点叫做酶的活性中心（active site）。

酶的催化作用

酶的催化能力是很惊人的。一般由酶催化的化学反应速度比自发进行的化学反应速度快 $10^8 \sim 10^{20}$倍。酶催化一个特定的化学反应必须经过 2 个步骤：①与正确的底物结合；②将底物定位到酶活性位点的氨基酸上，并使酶与底物结合生成 E-S 复合物（图

5.6)，这样有助于调整反应基团，将适当的作用力作用到底物（S）特定的化学键上。使生成酶-底物复合物所需要的活化能降低，反应更易于进行（图 5.5）。图 5.6 总结了糖酵解中果糖二磷酸醛缩酶的急剧变化过程（见 5.10 节）。

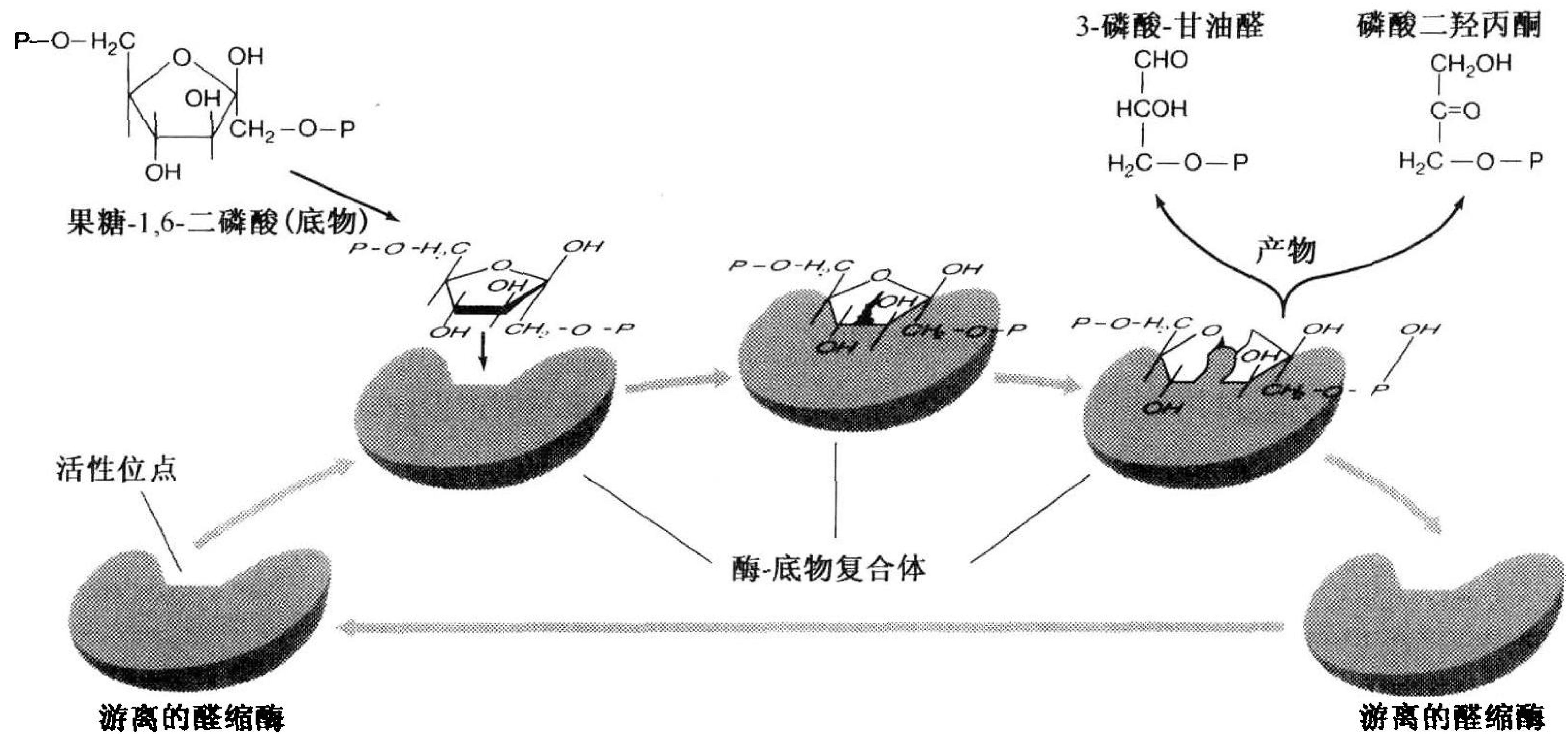


图 5.6　果糖二磷酸醛缩酶的催化循环。此酶催化糖酵解（图 5.14）中的下面反应：果糖-1，6-二磷酸→3-磷酸甘油醛＋磷酸二羟丙酮。在酶-底物复合物形成过程中，一旦结合了底物果糖-1，6-二磷酸，酶的构型就发生改变，就会对底物中特定的键产生张力，使底物中特定键断裂产生两种产物。

需要指出的是图 5.5 描述的是一个放能反应，因为底物的生成自由能大于反应物的生成自由能，即产物形成后伴随着能量的释放。酶也能催化吸能反应，使含能量少的底物转变成富含能量的产物。在这种情况下，不仅可以克服活化能的障碍，还可以向体系内输入足够的自由能，以提高底物的能量水平，使之转化成产物。这是通过将一个需能反应和一个产能反应（如 ATP 的水解反应）偶联起来实现的。

理论上说所有的酶对正逆反应都起作用，但实际上，酶在催化高放能反应和高吸能反应总是单向进行的。如果在细胞代谢过程中，一个特殊的反应需要逆转，则经常需要一个不同的酶来参与这个逆反应。

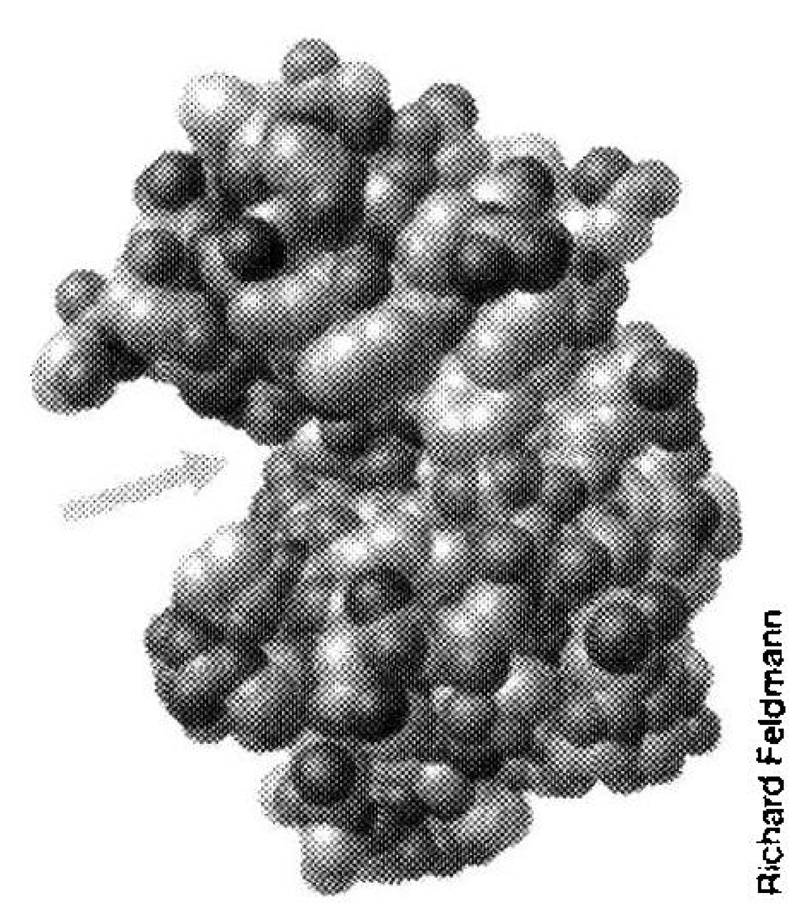


图 5.7　计算机设计出的溶菌酶空间构造模型。底物结合位点（催化位点）位于模型左侧那个细长的裂缝中，4.8 节中仔细讨论了溶菌酶的活性。

酶的结构和命名

大多数酶是蛋白质，是由氨基酸（见 3.6～3.8 节）组成的亚基构成的多聚体。每一种酶都有它特定的三维空间构型。因此，特定的蛋白质具有特定的结合和物理特性。可以通过计算机构建的空间填充模型非常容易地看清楚一种酶的精确构型(图 5.7)。例如，在溶菌酶中，最大的裂缝就是底物结合位点。

许多酶含有非蛋白成分的小分子物质，它们参与酶的催化作用，一般不把它们当作底物。根据与酶结合的特性，可以把这些小分子物质分成两大类，即辅基和辅酶。

辅基（prosthetic group）一般与酶蛋白结合非常牢固，是持久性的共价结合。存在于细胞色素中的亚铁血红素就是一种辅基（见5.11节），在以后章节中我们会详细讨论细胞色素。辅酶（coenzyme）是指与酶结合较为疏松的小分子，在生长的不同时期，单一的辅酶分子可以与许多不同的酶结合。许多辅酶都是维生素的衍生物。

酶既可以根据它们催化的底物命名，也可以根据它们催化的反应类型来命名。在酶后面一般都后缀-ase，因此纤维素酶（cellulase）是分解纤维素的酶，葡萄糖氧化酶（glucose oxidase）是催化葡萄糖氧化的酶，核酸酶（ribonuclease）就是降解核酸的酶。现在已经使用正式的命名系统对酶进行更为精确的分类。在这一命名系统中，根据所催化的化学反应种类的不同对酶进行了数字编码。但从本书的目的出发，以-ase结尾的命名就够用了。

概念检查

反应发生之前，反应物必须被激活，这种激活需要催化剂。酶是能加速化学反应速度的催化蛋白。酶对它们催化的反应具有高度特异性。这种特异性取决于蛋白质中多肽的三维结构。

- 催化剂的作用是什么？
- 哪种类型的大分子是酶？
- 底物结合在酶的哪个部位？
- 什么是活化能？

Ⅲ 氧化-还原和高能化合物

细胞中的能量守恒涉及氧化-还原反应［oxidation-reduction (redox) reaction］。反应中释放的能量以高能化合物（如ATP）的形式储存起来。在此我们来看一下氧化还原反应和存在于细胞中原生质和原生质膜上的电子传递体。然后看一下氧化还原反应中储存能量的化合物的实质。

5.6 氧化-还原

化学上，从物质中移去一个或多个电子叫氧化作用，而物质接受一个或多个电子就称为还原作用。在生物化学中，氧化还原作用不只是指电子传递，还指整个氢原子的传递。一个氢原子（H）中含有一个电子和一个质子。当电子被移去时，H原子就变成了质子（或氢离子H^+）。有时在一个氧化还原反应中，需要弄清楚只有电子传递还是只有H原子传递，有时不需要弄清楚这种区别（见5.11节和5.12节）。

电子载体和受体

氧化还原反应中提到的电子，不但需要有一个电子供体提供，还需要有一个电子受体接受。例如，H_2被氧化时会释放出电子和H^+（质子），$H_2 \rightarrow 2e^- + 2H^+$。而电子不

能在溶液中存在，它们必须是原子或分子的一部分。上面所描述的那个反应，只能提供给我们化学信息，它本身并不代表一个真实的反应。那个反应也只是一个半反应，半反应（half reaction）这个术语意味着需要另一个半反应。因为任何一个氧化作用的发生必须紧随其后出现一个相应的还原作用。例如，H_2的氧化作用必须与许多（包括O_2）不同物质的还原作用相耦合，使之作为另一个半反应：

$$1/2O_2+2e^-+2H^+\rightarrow H_2O$$

这个半反应是一个还原作用，当与上面的氧化作用相耦合时，就会产生下面的平衡反应 $H_2+1/2O_2\rightarrow H_2O$。在这种类型的反应中，我们将被氧化的物质作为电子供体，在这里指 H_2，而被还原的物质作为电子受体，这里指 O_2（图 5.8）。生物氧化-还原作用的关键就是保持合适的半反应的连续性。一个反应必须含有一个电子供体，而另一个反应必须具有一个电子受体。

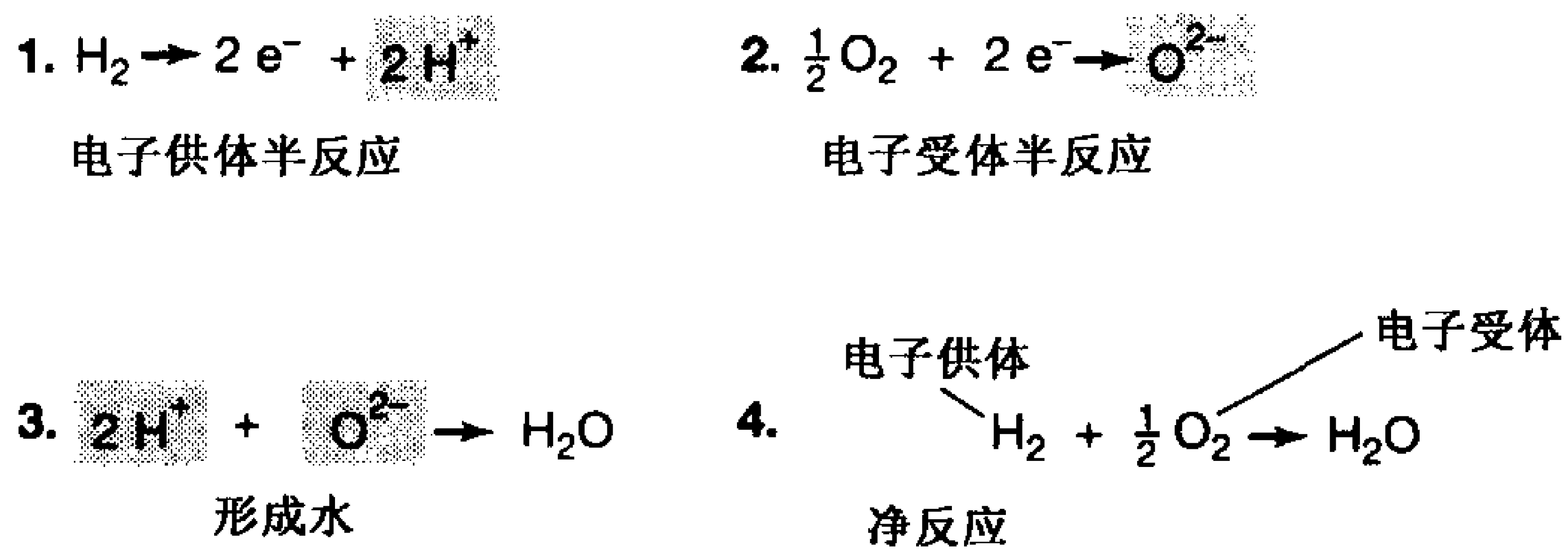


图 5.8 氧化还原反应举例。由电子供体和电子受体形成 H_2O。

还原电势

物质被氧化时释放电子的能力不同，物质被还原时接受电子的能力也不同。这种能力倾向就表示为半反应的还原电势（reduction potential）（E_0'，标准情况）。还原电势是以标准物质 H_2作为参照，用化学方法测量到，用 V 来测量。一般用还原形式的半反应表示还原电势。在某些情况下，如果质子参与了反应，则还原电势在某种程度上要受到 H^+浓度（pH）的影响。一般生物体中的还原电势是在 pH 7 的情况下检测的，因为细胞质是中性或近似中性。按这种惯例，在 pH 7 的情况下，反应 $1/2O_2+2e^-+2H^+\rightarrow H_2O$ 的还原电势 E_0'是+0.816V，而下面这个反应 $2H^++2e^-\rightarrow H_2$的还原电势 E_0'是−0.421V。后面我们会看到，这些 E_0'数值表明氧气是一种优良的电子受体，而氢气是一种很好的电子供体（图 5.8）。

氧化-还原作用的偶联及完整的氧化还原反应

在不同的条件下，许多分子既可以作为电子供体也可以作为电子受体，这决定于它与何种物质起反应。可以认为在半反应箭头的任一侧都代表了一个氧化-还原(O-R)偶极对，如 $2H+/H_2$或$\frac{1}{2}O_2/H_2O$。写一个氧化还原偶极对时，氧化态总是放在左侧。

若从它们组建的半反应中构建一个完整的氧化还原反应，最简单的是要记住氧化还原偶极对中被还原物质的还原电势具有较大的负值，它可以把电子传给氧化还原偶极对中被氧化的物质，而被氧化物质的还原电势具有较大的正值。因此，在 $2H^+/H_2$偶极对中还原电势是−0.42V，其中 H_2具有较强的提供电子的倾向。另一方面，

在$\frac{1}{2}O_2/H_2O$偶极对中还原电势是＋0.82V，H_2O提供电子的能力就较弱，但O_2具有较强的接受电子的倾向。在H_2和O_2的反应中，H_2作为电子供体被氧化，O_2作为电子受体被还原（图 5.8）。

按照化学上的习惯，所有半反应都写成还原反应。但在实际的氧化还原反应中，两个半反应中必须有一个写成氧化反应，即向相反的方向进行。因此，需要注意图 5.8 中所表示的反应：H_2氧化生成 $2H^+ + 2e^-$就是由正常写为还原反应的半反应逆转而来。

电子塔

研究生物体系中电子传递的一个简便方法就是设想有一垂直的电子塔（图 5.9）。电子塔代表了氧化-还原偶极对的还原电势范围，位于电子塔最上面的具最高负电势的偶极对，而位于塔底部的却代表了最高正电势的偶极对。位于塔顶部的偶极对中的还原

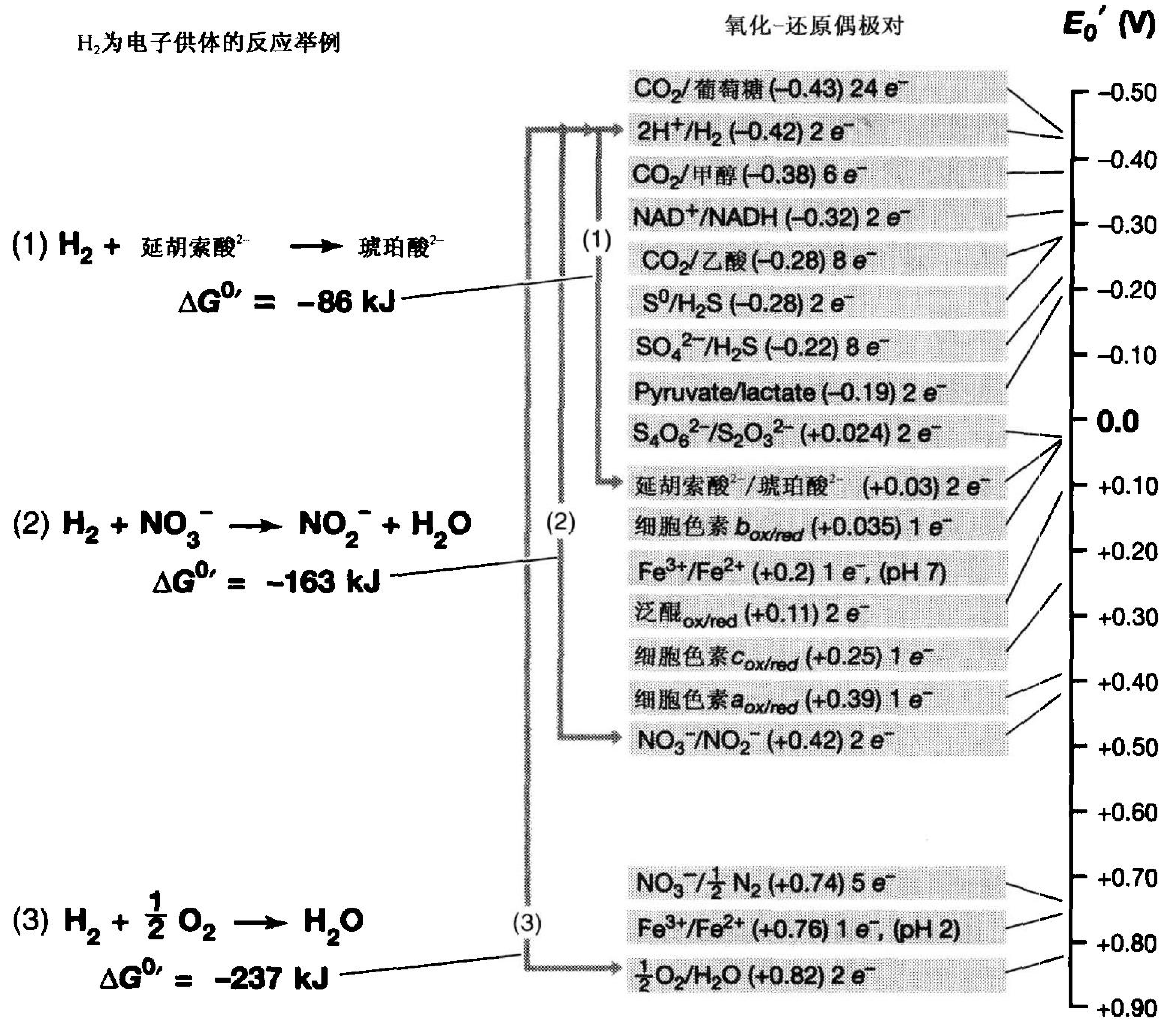


图 5.9　电子塔。在电子塔顶部排列最强的还原物（负还原电势）的氧化还原偶极对，而在电子塔的底部排列着最强的氧化物（正还原电势）的氧化还原偶极对。当电子从塔顶部向下传递时，它可以被不同水平的电子受体所捕捉。在被捕捉之前，电子降落得越远，电子供体和电子受体之间的还原电势差就越大，释放出的能量就越多。图左侧列出了这方面的例子，即当单一的电子供体 H_2与 3 种不同的电子受体延胡索酸、硝酸及 O_2反应时所释放的能量不同。

性物质具有提供电子的能力最高，而位于塔底部的偶极对中的氧化性物质具有最大的接受电子的倾向。

电子从位于塔顶部的电子供体向下传递时，它可以被不同水平的电子受体所捕获。两种物质之间的电势差用 $\Delta E_0'$表示。在电子被电子受体捕获之前，从电子供体跌落得越远，它释放出的能量就越多，即 $\Delta E_0'$与 $\Delta G^{0\prime}$是成正比的（图 5.9）。O_2位于电子塔的底部，是生物体常利用的电子受体。在电子塔中间的氧化还原偶极对，既可以作为电子供体也可以作为电子受体。例如，$2H^+/H_2$的偶极对的还原电势为－0.42V，延胡索酸/琥珀酸偶极对的还原电势为＋0.02V，因此，H_2（电子供体）的氧化反应可以与延胡索酸（电子受体）的还原反应相偶联：

$$H_2 + \text{延胡索酸} \rightarrow \text{琥珀酸}$$

另一方面，琥珀酸氧化成延胡索酸可以与 NO_3^- 或者$\frac{1}{2}O_2$的还原相偶联。

$$\text{琥珀酸} + NO_3^- \rightarrow \text{延胡索酸} + NO_2^- + H_2O$$

$$\text{琥珀酸} + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow \text{延胡索酸} + H_2O$$

因此，在没有氧（缺氧）而有 H_2存在的情况下，延胡索酸是作为电子受体（产生琥珀酸），而在其他条件下（如有 NO_3^- 存在的缺氧情况或有氧情况），琥珀酸可作为电子供体（产生延胡索酸）。实际上，这里所描述的包括延胡索酸和琥珀酸在内的所有变化都需要微生物在一定的营养环境条件下进行。

电子供体⟷能源

电子供体在被氧化时会放出能量，因此电子供体经常被称作能源。自然界中有很多潜在的电子供体，包括不同种类的有机物和无机物（第 17 章和第 19 章）。然而，并非电子供体本身含有能量，而是在电子供体被氧化的化学反应中能释放出能量。在一个反应中合适的电子供体与电子受体同等重要。反应中释放能量的多少依赖于电子受体和供体的实质。两个半反应之间的还原电势相差的越多，反应时释放出的能量就越多（图 5.9）（同时见附录 1）。

概念检查

氧化还原反应涉及电子从供体向受体的传递。化合物接受和释放电子的能力可以用还原电势 G_0'定量表示。

- 下面反应中电子供体和受体是什么？ $H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$
- $2H^+/H_2$对的 $G^{0\prime}$是什么？质子是好的电子受体吗？为什么？
- 为什么 NO_3^- 作为电子受体比延胡索酸要好？

5.7 作为氧化还原反应电子传递体的 NAD^+

细胞内氧化还原反应是电子从供体到受体的传递过程，这个过程中常包含一个或多

个中间携带物，这种携带物就称为载体。一旦使用了这种载体，我们所指的起始供体就是原初电子供体（primary electron donor），而最后的电子受体为最终电子受体（terminal electron acceptor）。整个反应的一系列净的能变化是由原初电子供体和最终电子受体之间的还原电势差决定的。

电子载体可分为两类：自由扩散型和与细胞膜中的酶紧密结合的类型（辅酶）。在细胞膜中，与膜紧密结合型的电子载体的功能与电子传递反应有关，第5.11节中将详细讨论这一点。自由扩散型的电子载体包括 NAD^+ 和 $NADP^+$（图5.10）。NAD^+ 和 $NADP^+$ 都是H原子的载体，且在电子传递链中总是把2个H原子传递给下一个载体，这里H原子的传递是指脱氢作用。

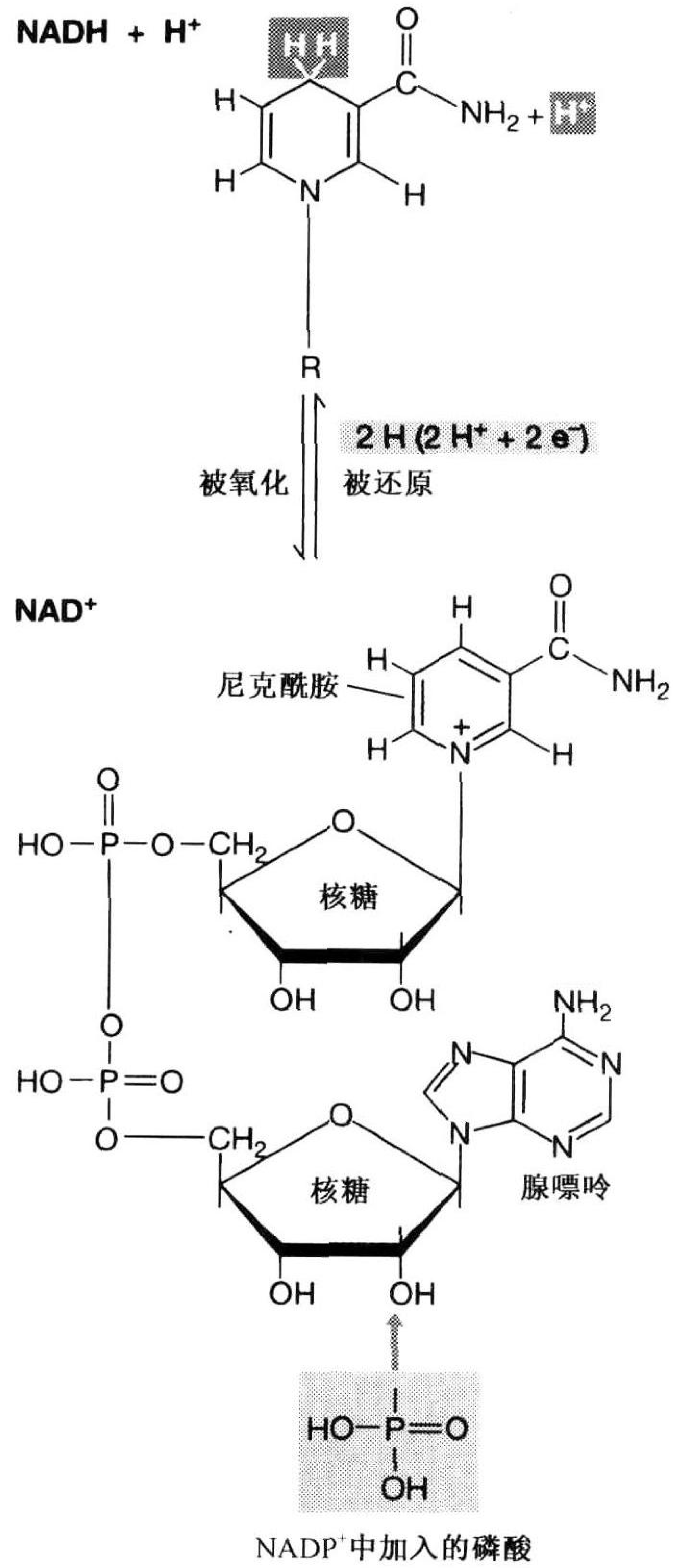


图5.10 **氧化还原辅酶 NAD^+ 的结构。**$NADP^+$ 中存在着磷酸基团。NAD^+ 和 $NADP^+$ 都经历了氧化还原反应，都是可以自由扩散的，都是两个电子和两个质子的载体。图中的R基团是腺苷二核苷酸。

$NAD^+/NADH$（或 $NADP^+/NADPH$）电极对的还原电势约为−0.32V，一般位于电子塔上相当高的位置，即NADH（或NADPH）是很好的电子供体。虽然 NAD^+ 和 $NADP^+$ 的电极对具有相同的还原电势，但它们在细胞中的功能却大不相同，$NAD^+/NADH$ 直接参与产能（分解）反应，而 $NADP^+/NADPH$ 则主要参与生物化学中的合成反应。

$NAD^+/NADH$ 循环

辅酶增加了细胞中可能的氧化还原反应的多样性。可以使化学上不相似的物质以最初电子供体和最终电子受体的形式起作用，起中间电子载体的作用。以 $NAD^+/NADH$ 为例，从一种物质上得到的电子可以将 NAD^+ 还原为NADH，而后者又可以将电子传递到第二种分子上。图5.11说明 $NAD^+/NADH$ 在这两部分反应中的作用。二者是简单的中介物，反应过程中没有被消耗。因此，与那些细胞中大量需求的初级电子供体和终极电子受体不同，细胞中只需要有少量的辅酶 $NAD^+/NADH$ 存在，数量能满足氧化还原反应就可以。

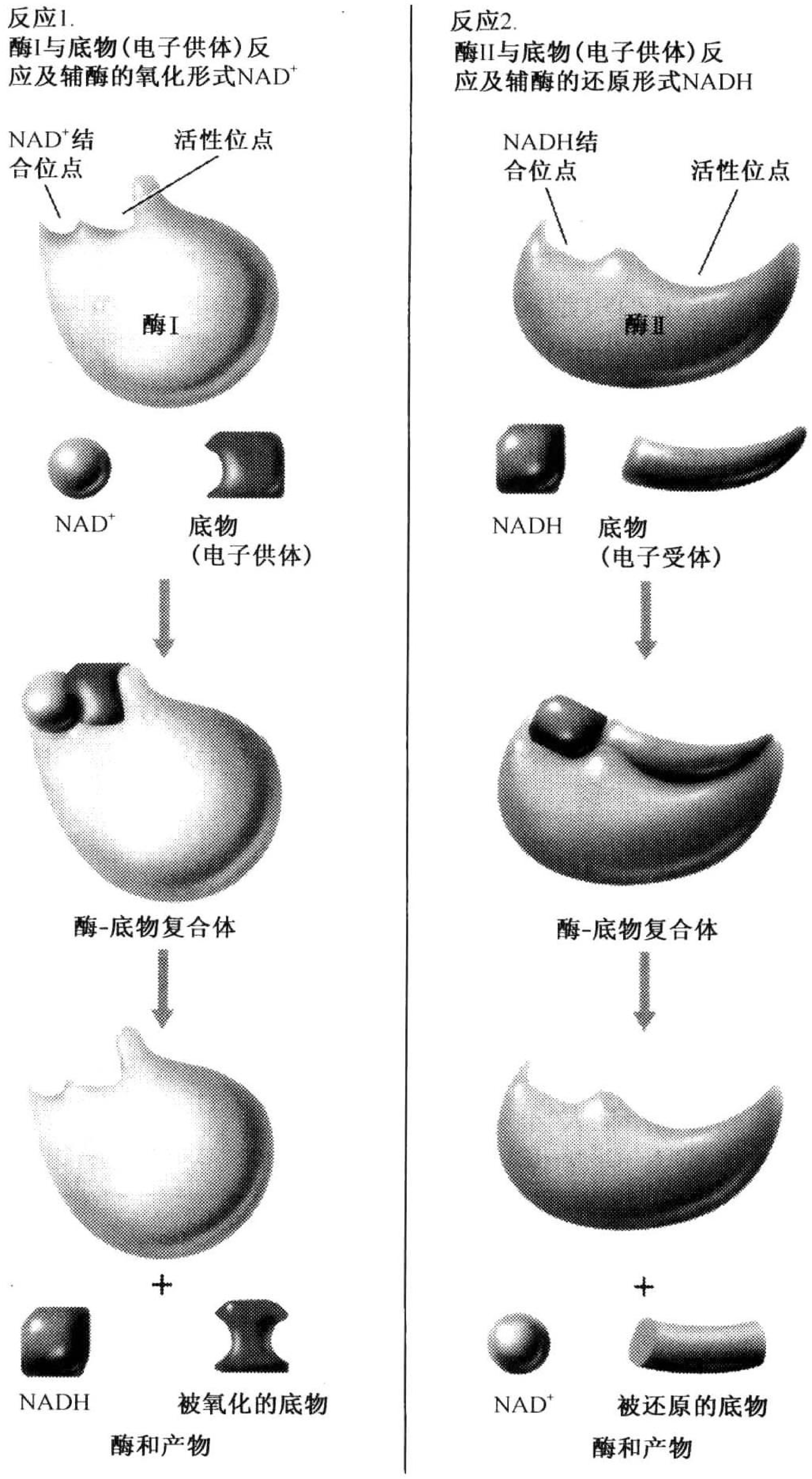


图 5.11 氧化还原反应的示意图。反应中涉及氧化和还原形式的辅酶 NAD^+ 和 NADH。

概念检查

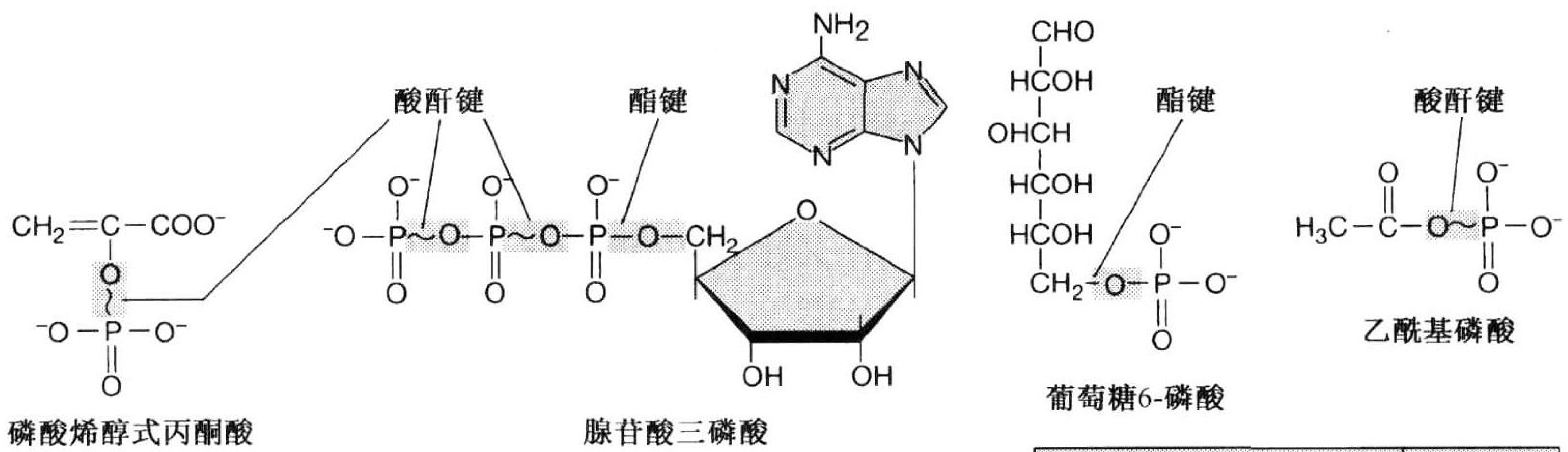
将电子从供体传递到受体一般需要一个或者多个载体。有些电子供体是膜整合的，而另外一些如 NAD^+/NADH，它们是可以自由扩散的，在细胞中能将电子从一个地方传递到另外一个地方。

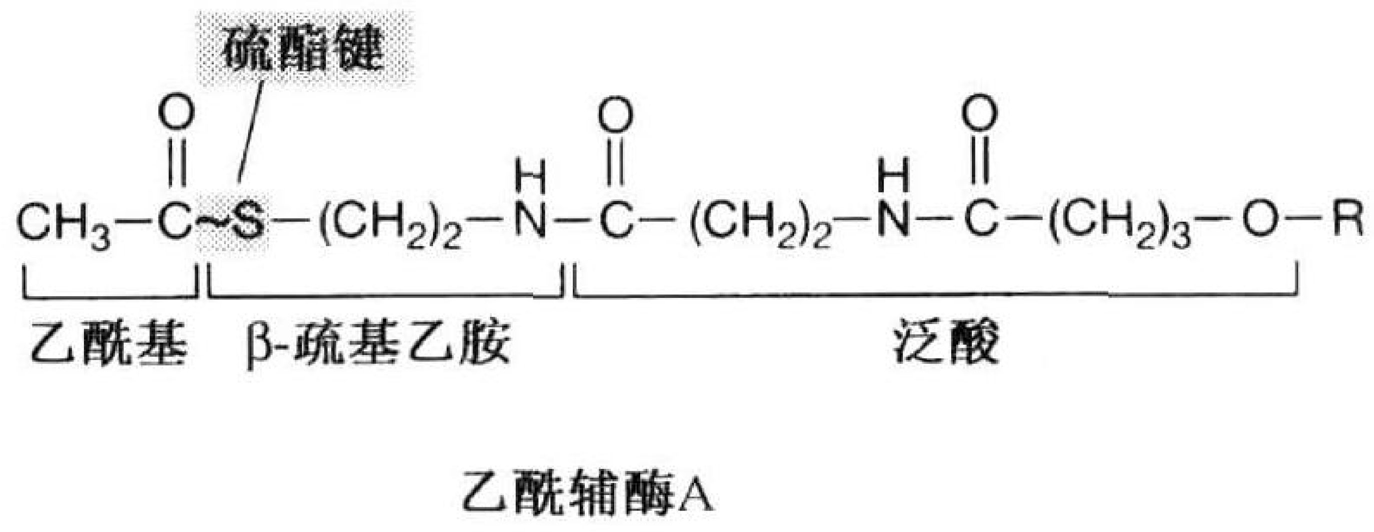
◆ NADH 是比氢气还好的电子供体吗？用图 5.9 说明为什么？

5.8 高能化合物和能量储存

一旦能量从氧化还原反应中释放出来，就必须被细胞储存起来才能用于各种不同需能活动。生命有机体内，氧化还原反应所释放出的化学能通常以高能磷酸键的形式传递给多种磷酸化合物，尤其是 ATP。这些物质叫做高能化合物（energy-rich），因为这些磷酸酯键水解释放出的能量要比细胞中其他共价键释放的能量多。

磷酸化合物中，磷酸基团一般由氧原子以酯键或酸酐键形式连接起来（图 5.12）。但并非所有的磷酸键都是高能键。作为磷酸键能的一种表示方式，当磷酸遇水时就会水解并释放出自由能。如图 5.12 所示，在 6-磷酸葡萄糖中水解磷酸键的 $G^{0\prime}$ 仅为 −13.8kJ/mol，而水解磷酸烯醇式丙酮酸中的磷酸键的 $G^{0\prime}$ 为 −51.61kJ/mol，几乎是水解 6-磷酸葡萄糖 $G^{0\prime}$ 的 4 倍。因此，像磷酸烯醇式丙酮酸这种磷酸酐，才能被认为是高能化合物（表 3.1），而 6-磷酸葡萄糖却是一种磷酸酯，并不是高能化合物。尽管理论上任何种类化合物水解都可以产生能量，但细胞通常利用那些自由能大于 −30kJ/mol 的化合物作为能量货币（图 5.12 和表 17.6）。





化合物	$G^{0\prime}$ kJ/mol
$\Delta G^{0\prime}$ > 30kJ	
磷酸烯醇式丙酮酸	−51.6
1,3-二磷酸甘油酸	−52.0
乙酰基磷酸	−44.8
ATP	−31.8
ADP	−31.8
乙酰辅酶A	−31
$\Delta G^{0\prime}$ < 30kJ	
AMP	−14.2
葡萄糖6-磷酸	−13.8

图 5.12　细胞中能量转换方面一些重要的化合物。上面表中列出了一些主要磷酸酯和磷酸酐水解所释放出的自由能，并显示出磷酸酯键的键能比其他形式的键能高，同时也给出了四种化合物的结构示意图，以表示低能键和高能键所在部位。ATP 含有三个磷酸，但只有两个高能磷酸键水解的自由能大于 30kJ。同时还有乙酰辅酶 A 的结构。C 和 S 之间的硫脂键的水解自由能大于 30kJ，乙酰辅酶 A 的 R 基团是 3′-磷酸 ADP 基团。

腺苷酸三磷酸（ATP）

生物体内最重要的高能化合物是 ATP（adenosine triphosphate）。ATP 包含腺嘌呤

核苷酸，在它上面连着三个磷酸分子（图 5.12）。ATP 是生物体中重要的能量载体，它在放能反应中产生，并用于吸能反应的进行。从 ATP 的结构示意图上（图 5.12）也能看到，ATP 中有两个磷酸键以磷酸酐的形式存在，其中含有的水解自由能要大于 −30kJ/mol。因此，反应 ATP→ADP＋Pi 和 ADP→AMP＋Pi 释放的能量都大约为 32kJ/mol（图 5.12）。

尽管 ATP 水解释放的能量大约为 32kJ/mol，但必须引入一个限制条件才能更精确地确定合成 ATP 所需的能量。在生长活跃的细胞中 ATP/ADP 的比例很高，大约为 1000。这种比例明显地影响了合成 ATP 时所需的能量。在这种细胞中，合成一摩尔 ATP 实际消耗的能量（即 G^0，见 5.4 节）为 −55～−60kJ。然而，为了研究生物能学基本原理，我们还是沿用了标准状态，将合成和水解 ATP 的能量都认为是 32kJ/mol。

辅酶 A

除了高能磷酸化合物以外，细胞内还产生了另外几种高能化合物，它们也能储存放能反应所释放的能量。这些高能化合物包括辅酶 A 衍生物（如乙酰辅酶 A，图 5.12）。辅酶 A 衍生物包含硫酐（硫酯）而不是磷酸酐键（图 5.12 和表 3.1），它能在水解时释放出足够的自由能去推动高能磷酸键的合成，如在下面这个反应中：

$$乙酰\text{-S-}辅酶\ A + H_2O + ADP + Pi \rightarrow 乙酸盐 + HS\text{-}辅酶\ A + ATP + H^+$$

辅酶 A 水解释放的能量储存在 ATP 中，辅酶 A 的衍生物（乙酰辅酶 A 只是其中的一种）对厌氧微生物（尤其是通过发酵获得能量的微生物）的能量产生而言是非常重要的（见 5.10 节、17.19 节和 17.20 节）。在第 17 章中还将再次讨论这些微生物的重要性。

长期的能量储存

细胞中的 ATP 是一个动态实体。它被不断地降解以推动生物合成反应的进行，又不断以分解代谢为代价重新合成。然而，在生长旺盛的细胞中，ATP 以非常低的浓度存在，为 2mmol/L。微生物常通过产生不溶性的多聚物来长期地储存能量，今后可以通过氧化这些多聚物产生 ATP。

原核生物中长期储存能量的例子包括葡萄糖多聚物糖原（图 3.6）、脂类多聚物 β-聚羟基丁酸盐和其他的多聚羟基烷酸（图 4.52）及硫元素，它们被储存在硫化能营养微生物中（图 2.10b）。这些多聚物以大颗粒的形式储存在细胞中，在光学和电子显微镜下可以看到（见 4.11 节）。真核微生物中，多个葡萄糖以淀粉（图 3.6）的形式存在，脂类以脂肪（图 3.7）的形式存在，淀粉和脂肪是储存物质的主要形式。在缺少外来能源的情况下，此时细胞处于一种非生长状态，细胞氧化这些物质来制造新的细胞物质或者是提供维持细胞整体性所需的能量，这些能量叫做维持能量（maintennance energy）。

概念检查

氧化还原反应中释放的能量储存在某些形式的包含磷酸键和硫脂键的高能化合物中，最常见的是 ATP，它是细胞中主要的能量载体。能量的长期储存与多聚物的形成

有关，可以通过消耗这些多聚物产生 ATP。

◆ 每摩尔 ATP 在转化为 ADP+Pi 的时候释放的能量为多少？每摩尔 AMP 转化为腺苷和磷酸的时候释放的能量为多少？

◆ 在经过一个富含能量的阶段后，细胞如何为后面的能量缺乏阶段做准备？

Ⅳ 主要的代谢途径、电子传递和质子动力

下面看一下微生物中一些常见的代谢反应。首先比较一下发酵和呼吸过程，然后再分别加以仔细地研究。而后讨论一下质子动力，它是呼吸和其他代谢过程（包括无氧呼吸、光合作用和化能营养）的主要产物。除产生 ATP 外，质子动力还为细胞的一些其他活动（如传递反应及摆动和滑动）提供能量（见 4.7 节和 4.14～4.16 节）。

5.9 能量守恒：选择

在化能有机营养微生物中有两种能量储存机制：发酵和呼吸。每种机制中 ATP 的合成都是由氧化还原反应中释放的能量所驱动。然而，两种机制中氧化还原反应的差别很大。发酵（fermentation），即氧化还原反应是在没有任何终端电子受体存在的情况下发生的。呼吸（respiration）过程中氧分子和其他氧化物作为终端电子受体。

由于每个氧化反应必须和还原反应偶联，因此发酵反应中的氧化反应与来源于电子供体的化合物的还原反应偶联起来。呼吸反应中，外来的电子受体被还原。发酵的实质限制了它获得的能量的多少，后面会比较发酵和呼吸过程中产生的能量。

底物水平磷酸化和氧化磷酸化

除了电子受体的本质不同之外，二者在产生 ATP 的机制上也不相同。发酵过程是通过底物水平磷酸化（substrate-level phosphorylation）产生 ATP 的。此过程中，ATP 是经过特定的酶催化有机物分解代谢产生的（图 5.13a）。这与氧化磷酸化（或电子传递）相反，在氧化磷酸化（oxidative phosphorylation）中，ATP 的产生是以消耗质子动力为代价的（图 5.13b）。第三种 ATP 合成的形式叫做光合磷酸化，发生在光合作用有机体中。光合磷酸化的机制与氧化磷酸化的机制相似，但在光合磷酸化过程中是光而不是化合物推动了产生质子动力的氧化还原反应（见 17.2 节）。

概念检查

发酵和呼吸是化能有机营养有机体通过氧化有机物存储能量的两种方式。代谢反应过程中，ATP 的合成是通过底物水平磷酸化（发酵）或者氧化磷酸化的方式合成的。

◆ 哪种形式 ATP 的合成需要细胞质膜的参与？为什么？

◆ 底物水平磷酸化和氧化磷酸化有何区别？

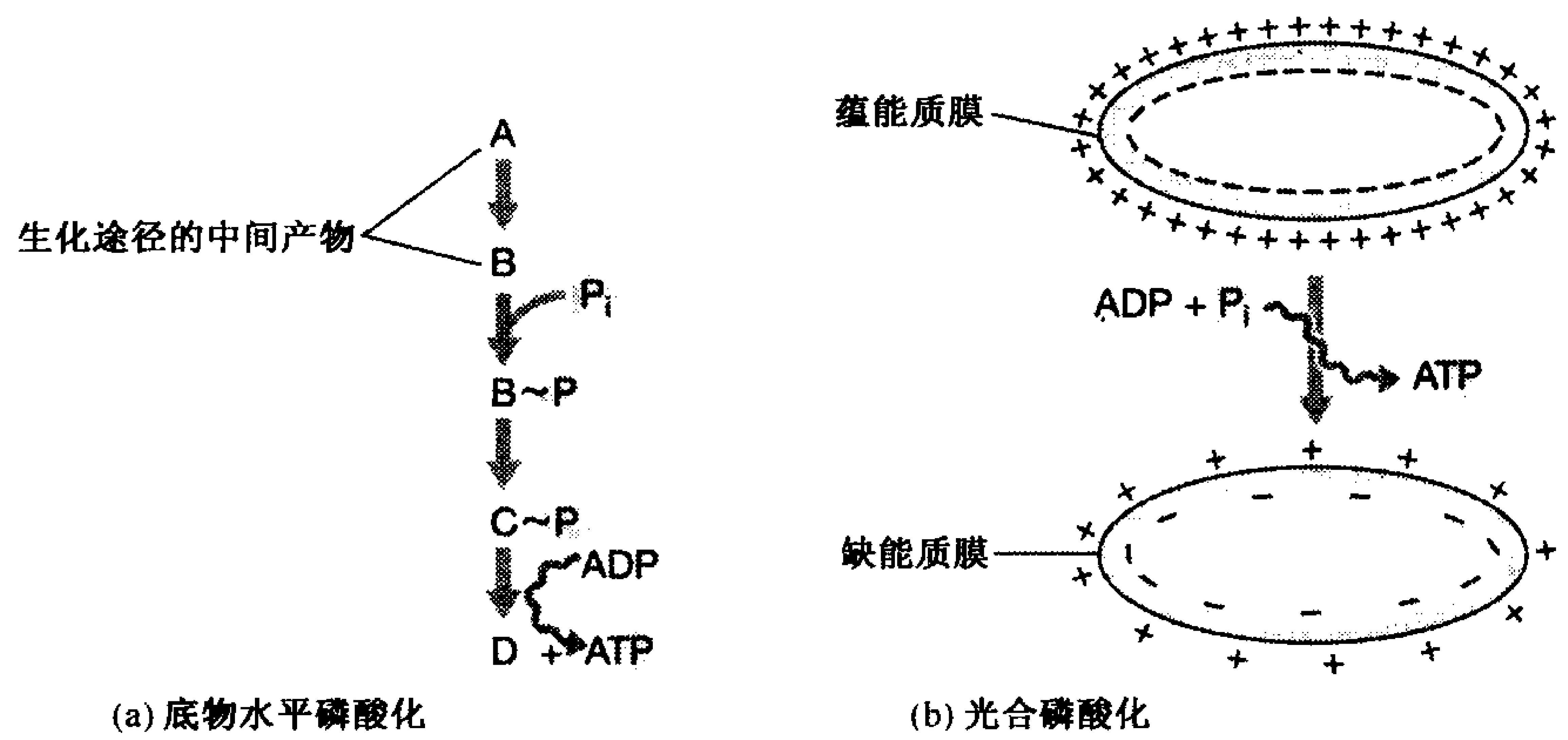


图 5.13 发酵和呼吸过程中的能量储存。(a) 发酵过程中，ATP 是在底物水平磷酸化过程中产生；此过程中磷酸基团被加到了某种中间产物上，最终将磷酸基团转移到 ADP 上形成了 ATP。(b) 呼吸过程中，被质子动力赋予能量的细胞质膜会消耗一些由 ADP 形成 ATP 的能量及在氧化磷酸化过程中的无机磷。质子动力的形成与 ATP 合成的偶联是通过一种称之为 ATP 合成酶的膜蛋白完成的（见 5.12 节和图 5.21）。

5.10 发酵的实例——糖酵解

正如所提到的那样，发酵是一种内部平衡的氧化还原反应。发酵过程中，电子供体的原子变得更加还原，而其他的则变得更加氧化，能量是以底物水平磷酸化形式储存起来。最常见的发酵过程是葡萄糖酵解（glycolysis），也被称为 EM 途径（Embden-Meyerhof pathway）。另外还有一些其他的发酵过程（第 17 章）。

糖酵解是一种无氧过程，可以分成三个主要步骤，每一步都包括一系列独特的酶催化反应（图 5.14），第一步是一系列的准备反应，不涉及氧化还原也不释放能量，但形成两分子的中间产物，即 3-磷酸甘油醛。第二阶段出现了氧化还原反应，高能磷酸键以 ATP 的形式产生，且产生 2 分子丙酮酸。第三阶段又一次出现氧化还原反应，生成发酵产物（如酒精和 CO_2 或乳酸）（图 5.14）

第一阶段和第二阶段：预备和氧化还原反应

第一阶段，葡萄糖被 ATP 磷酸化产生 6-磷酸葡萄糖。后者异构生成 6-磷酸果糖。第二步磷酸化生成 1，6-二磷酸果糖，其是糖酵解关键的中间物。醛缩酶（aldolase）催化 1，6-二磷酸果糖中的键断裂生成 2 分子三碳化合物：3-磷酸甘油醛和它的异构形式——磷酸二羟丙酮。需注意的是，到此还没有氧化-还原反应发生，所有反应（包括 ATP 消耗）是在没有电子传递的情况下进行的。

糖酵解的第二阶段，即从 3-磷酸甘油醛转化为 1，3-二磷酸甘油酸的过程中出现了氧化还原反应。在这个反应中（此反应发生 2 次，每次只是 1 分子的 3-磷酸甘油醛氧化）的辅酶是 NAD^+，它接受 2 个 H 原子变成 NADH，催化此反应的酶是 3-磷酸甘油醛脱氢酶。同时 3-磷酸甘油醛被磷酸化，每分子的 3-磷酸甘油醛中添加了 1 分子的无机磷酸。这个反应使无机磷变成有机磷形式，是通过底物水平磷酸化储存能量的，并使

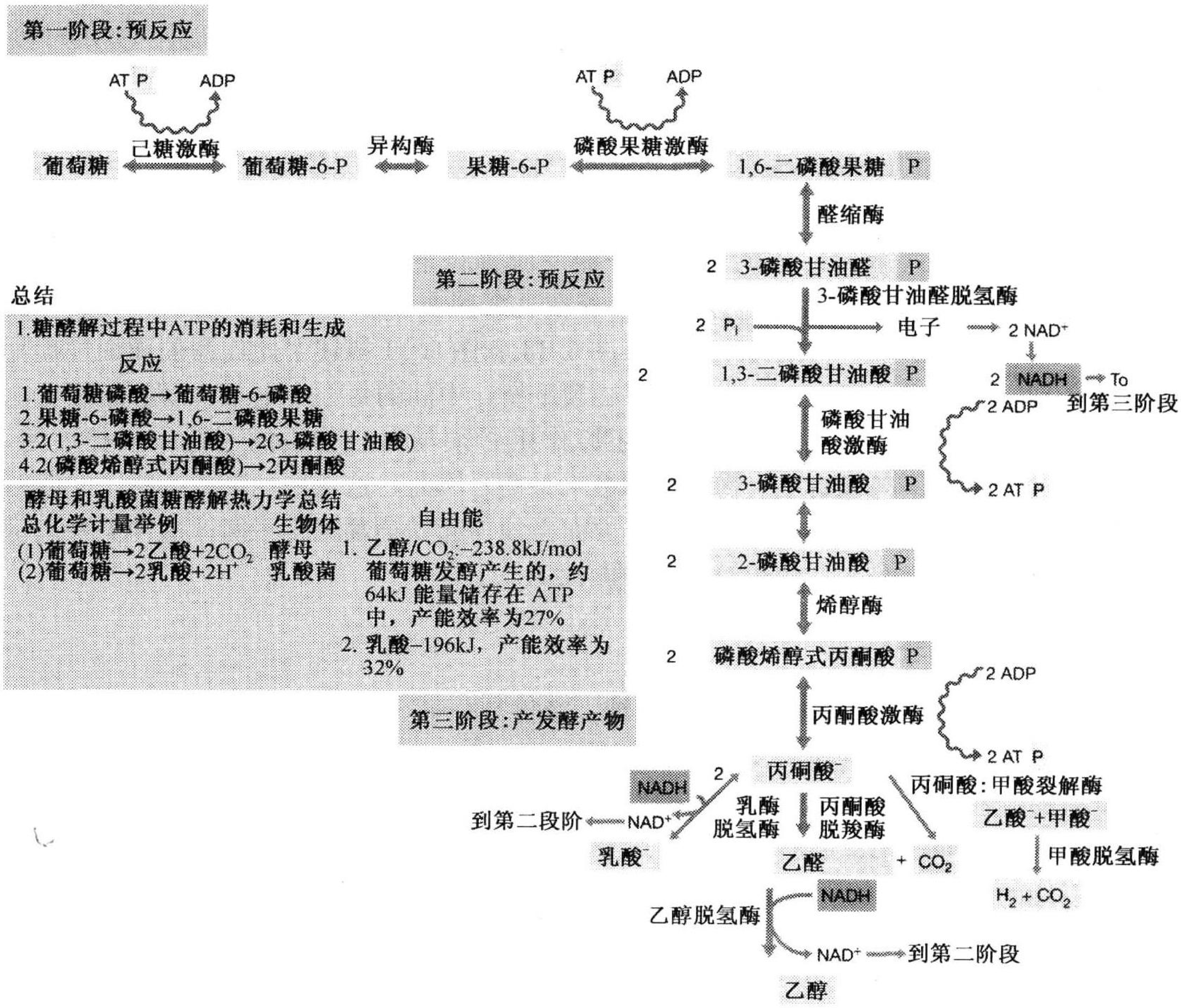


图 5.14　EM 途径（糖酵解）。经过一系列酶促反应，使葡萄糖转变成丙酮酸，而后生成发酵产物。需注意的是二磷酸果糖分裂时产生 2 分子 3-磷酸甘油醛，虽然很简单明了，但在图示中只表示出了 1 分子 3-磷酸甘油醛。此外，丙酮酸也是糖酵解中关键的“中心物质”——所有发酵产物都来自丙酮酸。

ATP 的生成成为可能，因为 1 分子的 1，3-二磷酸甘油酸中每一个磷酸都含有一个大于 30kJ 高能磷酸键（图 5.12）。当 1 分子的 1，3-二磷酸甘油酸变成 3-磷酸甘油醛时，就会出现 ATP 的生成，后面的烯醇式丙酮酸变成丙酮酸时，也会有 ATP 的生成（图 5.14）。

糖酵解中葡萄糖磷酸化过程消耗了 2 分子的 ATP，而后又生成了 4 分子的 ATP（其中两个来自 1，3-二磷酸甘油酸转变成丙酮酸的过程）（图 5.14）。因此，1 分子的葡萄糖发酵后，生物体净获得 2 分子的 ATP。

第三阶段：发酵产物的生成

在生成 2 分子 1，3-二磷酸甘油酸过程中，2 分子的 NAD^+ 被还原成 NADH（图 5.14）。但是，一个细胞内只含有少量的 NAD^+，如果所有 NAD^+ 都被还原成 NADH，

葡萄糖氧化将会终止。但是只要有可以接受电子的游离 NAD^+ 存在，3-磷酸甘油醛氧化就可继续进行。发酵过程中，丙酮酸转变为任何一种发酵产物时，都可以使 NADH 变成 NAD^+，因此就克服了"途径障碍"（图 5.14）。

在酵母中，丙酮酸被还原成酒精时就有 CO_2 放出。在乳酸菌中（或在剧烈运动的肌肉组织中缺氧情况下），丙酮酸被还原成乳酸。在许多原核生物发酵过程中，已经知道了许多不同的丙酮酸还原途径（第 12 章和第 17 章），但最后结果都相同，即 NADH 必须转变成氧化态形式 NAD^+ 才能使发酵产能反应进行下去。作为一种游离型的辅酶，NADH 可以脱离 3-磷酸甘油醛脱氢酶而附着在乳酸脱氢酶上使丙酮酸还原成乳酸，最后再以 NAD^+ 形式扩散，重复整个循环（图 5.14 和图 5.11 描述了此代谢的详细过程）。

在任何一种产能过程中，氧化与还原必须平衡，中间的每一个电子移动都必须有电子受体。糖酵解中，此酶催化的 NAD^+ 还原作用必须与另一物质的氧化作用相平衡，而且最后的产物必须与起始反应物（葡萄糖）平衡。因此，这里所讨论的产物，如酒精和 CO_2 或乳酸和质子，二者在原子或电子方面必须与起始葡萄糖相平衡，这种关系表示为葡萄糖＝2 乙醇＋$2CO_2$；葡萄糖＝2 乳糖＋$2H^+$。

葡萄糖发酵的最终结果

糖发酵的最终结果是消耗 1 分子葡萄糖，净得 2 分子 ATP 及产生发酵产物。对生物体而言，最重要产物是 ATP，发酵产物仅是一些废物，因为 ATP 可用于很多需能反应中。但对酿造者、奶酪制造者或者面包师（知识窗：酵母发酵的产品）而言，发酵产物并不是废物（知识窗：酵母发酵的产品）。因此，发酵不仅是产能过程，而且是一种能给人类产生有用的天然产品的过程。在第 30 章中将仔细讨论工业产品的发酵过程。

概念检查

糖酵解是发酵的一种主要形式，是无氧代谢的一种普遍方式。最终结果是释放一小部分能量，并以 ATP 形式储存起来，另外还产生一些发酵产品。糖酵解中每消耗 1 分子葡萄糖，产生 2 分子 ATP。

◆ 糖酵解中哪个反应涉及氧化和还原？

◆ 糖酵解中 NAD^+/NADH 的作用是什么？

◆ 糖酵解为什么会产生发酵产品？

5.11　呼吸及膜偶联的电子载体

在有外部电子受体存在的条件下会发生发酵过程，发酵只释放少量的能量，只生成了少量的 ATP 分子。依据氧化还原反应的正常规律，发酵过程只有少量能量释放出来是可以理解的，原因有两方面：①起始化合物中只有部分碳原子被氧化（图 5.14）；②起始电子供体和终端电子受体之间的还原电势差（即电子塔的垂直距离）很小。

然而，如果有 O_2 或其他某些外源电子受体存在，则整个底物分子可以完全被氧化成 CO_2，因此从理论上讲，可以有很多 ATP 产生。利用 O_2 作为外源电子受体使化合物

被氧化的过程叫有氧呼吸。

有氧呼吸的讨论既涉及碳的转化也涉及所发生的氧化还原反应。因此我们的讨论集中在两个问题上：①电子从有机化合物传递到终端电子受体并驱动 ATP 合成的途径；②有机碳转变成 CO_2 的生化途径。前者中 ATP 的合成是以消耗质子动力为代价的（图 5.13b）。我们从讨论电子流动开始。

电子传递载体

电子传递系统是由与膜结合的电子载体组成的。该体系有两个基本功能：①从一个电子供体接受电子并把它传递给另一个电子受体；②用储存的电子传递过程中释放的能量驱动 ATP 的合成。

电子传递过程中涉及几种类型的氧化还原酶：①NADH 脱氢酶（dehydrogenase），它可以从 NADH 中转移 H 原子；②含核黄素的电子载体，一般称为黄素蛋白（flavoprotein）（包括 FMN 和 FAD）；③铁硫蛋白（iron-sulfur protein）；④细胞色素（cytochromes），它们是含有由铁卟啉环的血红素蛋白。除此之外，还有一类非蛋白电子载体——醌。现在我们来稍微详细地讨论每一种电子传递成分。

知识窗：酵母发酵的产品

每一个啤酒制造商和酿造商都是一个有经验的“微生物学家”，或许他们并没有认识到这一点。实际上，产生能量的无氧过程是人类最伟大的发明核心：发酵的食物和饮料（图 1）。

在生产面包和大多数酒精饮料的过程中，人们利用酿酒酵母来产生乙醇和 CO_2。酵母（如酿酒酵母）在许多含糖丰富的环境如果汁和饮料中都有能力进行两个相反类型的代谢，即本章所讨论的发酵和呼吸。当有 O_2 存在的情况下，酵母以各种糖为底物，快速进行生长和繁殖，产生酵母细胞和 CO_2（后者来自于柠檬酸循环，见 5.13 节）。但是在没有 O_2 存在时酵母处于厌氧代谢，结果细胞繁殖减慢，却产生大量的酒精和 CO_2。



图 1 酿酒酵母发酵的主要产品。

葡萄园的葡萄上就有少量酵母细胞，葡萄被压成汁时，酵母细胞就进入葡萄汁中。饮料制造过程的前几天，酵母细胞在有 O_2 存在的情况下快速进行繁殖，使葡萄汁处于缺氧状态。一旦 O_2 被耗尽，就转变为发酵，开始了产生酒精的过程。从好氧到厌氧代谢的转变是非常重要的，要十分小心才能确保空气被排除在容器之外。

饮料只是由酵母制得的许多产物中的一种，其他包括啤酒和蒸馏酒，如威士忌、伏特加和荷兰酒（图 1）（见第 30 章知识窗，家庭酿造）。在蒸馏酒中，由酵母产生的酒精含量较低（占 10%～15%），而后通过蒸馏可使饮料中酒精达到 40%～60%。世界

上某些含糖丰富而石油短缺的地方（如巴西）都用酵母发酵产生乙醇，因为乙醇可作为发动机的燃料。在美国，用作工业溶剂的乙醇主要是通过以淀粉为发酵原料发酵产生。在面包制作中，酵母可作为发酵剂，此处不是乙醇而是乙醇发酵的另外的产物CO_2在起作用（图 5.14）。第 30 章将详细讨论酵母和酵母发酵产品。

不难想象低等的酵母细胞是如何对人类的日常生活产生影响的。在呼吸所需要的O_2不存在的情况下，酵母细胞被迫采取发酵的生存方式。酒精和CO_2除了作为糖酵解途径所产生的“废物”之外，二者还分别是制酒饮料业和烘烤工业的重要原料。

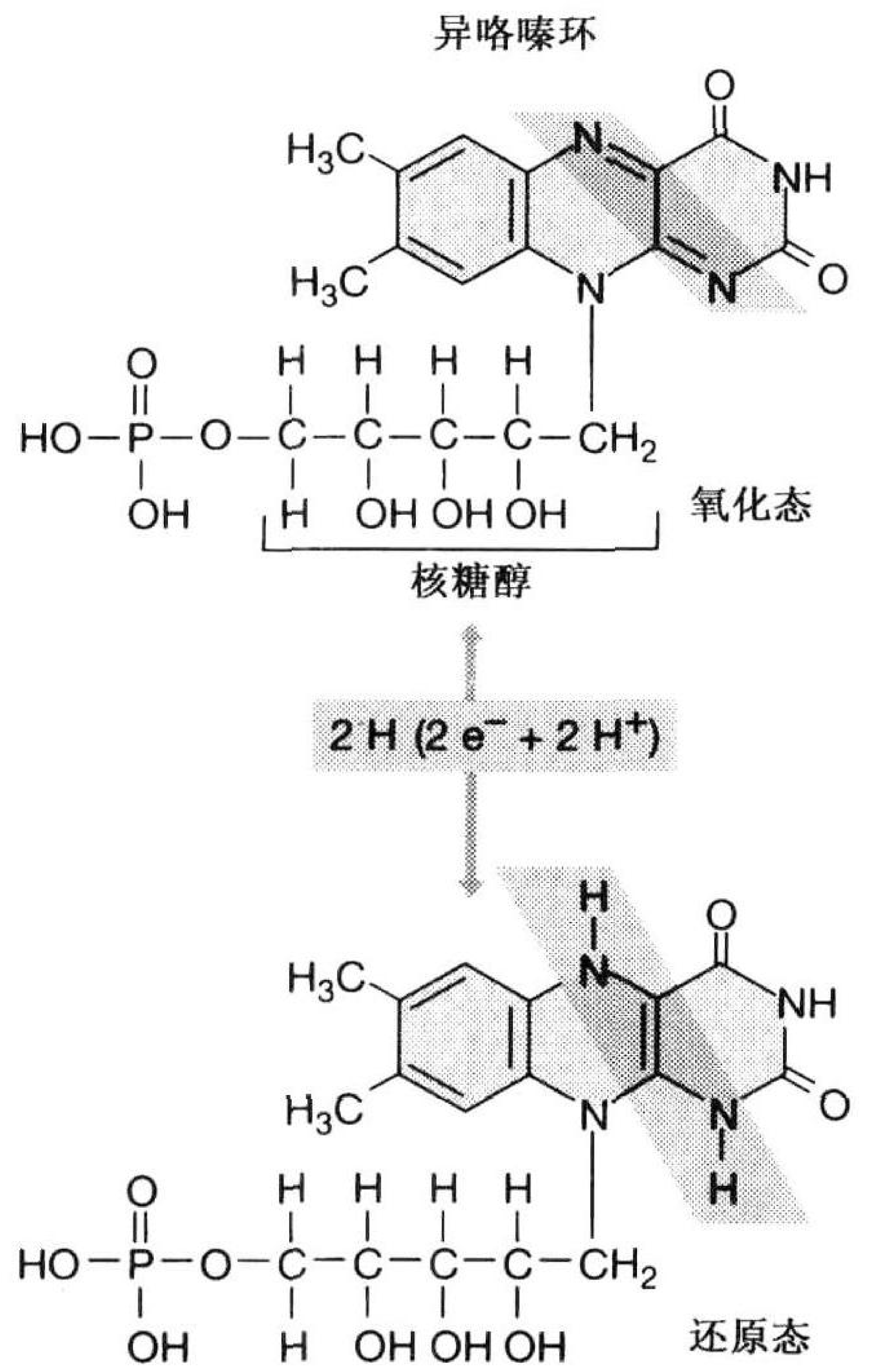


图 5.15 单核苷酸黄素（FMN）。FMN 和 FAD 中的氧化还原位点是相同的。

NADH 脱氢酶（NADH dehydrogenase）是结合于细胞膜内侧的蛋白质，有 NADH 结合位点，在将 NADH 转化为 NAD^+ 的过程中接受两个电子和两个质子（图 5.10），并把 H 原子和电子传递给黄素蛋白。

黄素蛋白（flavoprotein）是含核黄素衍生物的蛋白质（图 5.15），黄素部分是一种辅基，可以与蛋白质部分结合。当它接受到氢原子和电子时可以交替地进行氧化和还原。需要注意的是黄素蛋白接受氢原子和电子但只能提供电子。将在后面讨论这两个质子发生的反应。在细胞中一般能见到两种黄素，即黄素单核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸。黄素腺嘌呤二核苷酸中 FMN 是通过第二个磷酸与核糖和腺嘌呤相结合。核黄素又叫维生素 B_2，对某些生物体而言是必需的生长因子（见 5.2 节和表 5.3）。

细胞色素（cytochrome）是含有铁卟啉环的蛋白质（图 5.16），细胞色素通过自身中间部位的铁原子获得或丢失一个电子，进行氧化和还原作用。

$$细胞色素-Fe^{2+} \longleftrightarrow 细胞色素-Fe^{3+} + e^-$$

所知道的几类细胞色素的还原电势有所不同（图 5.9）。可以用字母来表示不同的细胞色素，如细胞色素 a、细胞色素 b、细胞色素 c 等。一个生物体内的细胞色素与另一个生物体内的细胞色素会有微小的差别，所以也可以这样表示细胞色素，如细胞色素 a_1、a_2、a_3 等。有时细胞色素也会与其他的细胞色素或 Fe-S 蛋白组成紧密的复合物，如细胞色素 bc_1 复合物，它含有 2 种不同 b 型细胞色素和一种 c 型细胞色素，在能量代谢中起着重要作用（见 5.12 节和图 5.20）。

除了与铁结合的血红素细胞色素外（图 5.16），在电子传递链中还有一种或几种非铁血红素蛋白（nonheme iron-protein）。这些蛋白质包含有成簇的铁和硫原子，其中 Fe_2S_2 和 Fe_4S_4 簇是最常见的（图 5.17）。铁原子与游离的 S 原子相结合，而蛋白质则通过其中的半胱氨酸残基与铁原子相结合（图 5.17）。铁氧还蛋白是生物体中最普通的一

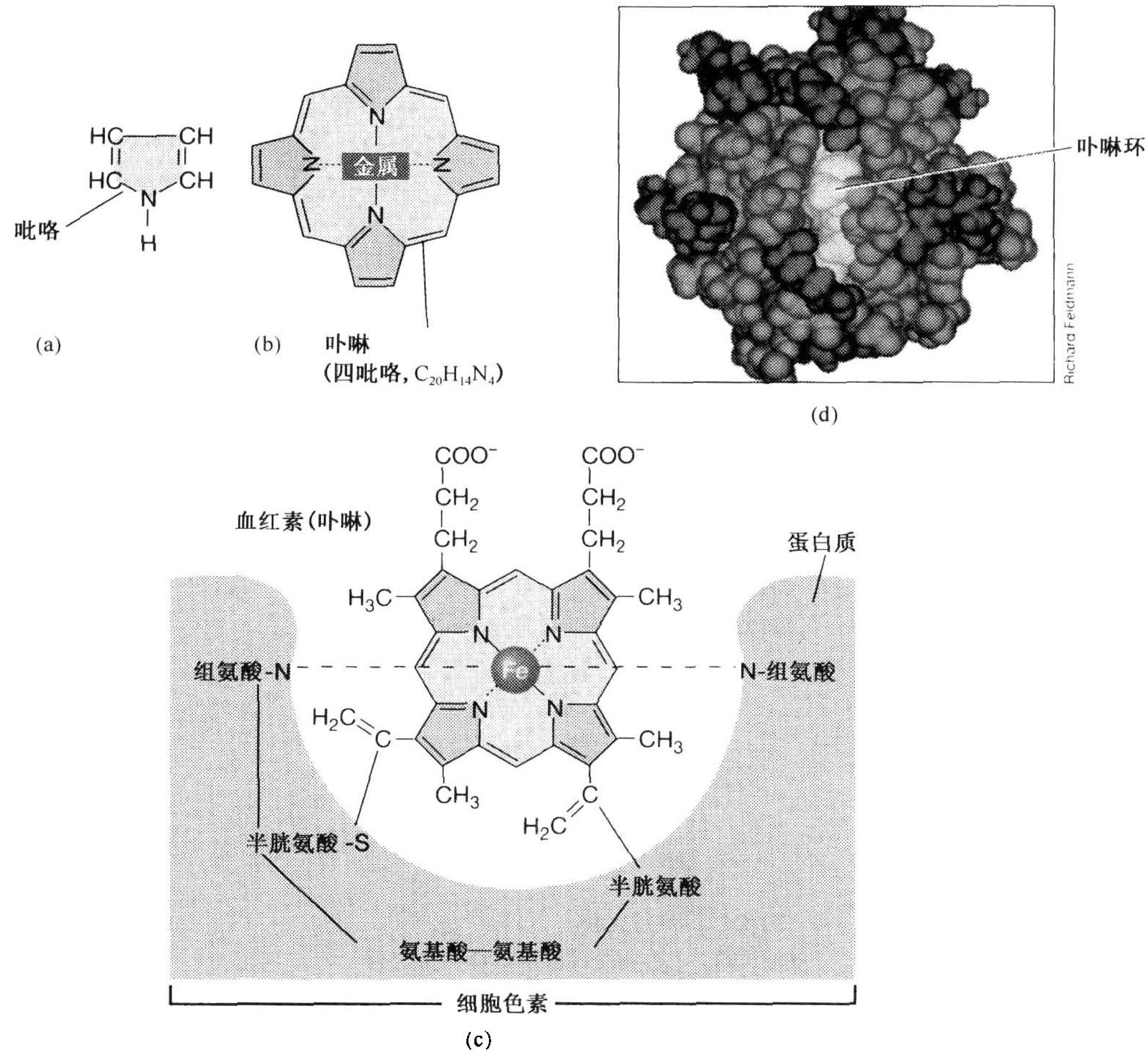


图 5.16　细胞色素及其结构。(a) 吡咯环结构。(b) 4 个吡咯环形成一个卟啉环，许多金属可以与卟啉环结合、如叶绿素中的 Mg^{2+} (见 17.2 节和图 17.3)、维生素 B_{12} 中的 Co^{2+} (见 30.7 节和图 30.12)，在某些独特的卟啉辅酶中的 Ni^{2+} (见 17.17 节和图 17.42)。(c) 在某些细胞色素 (如细胞色素 c) 中，卟啉环通过二硫键与蛋白质中半胱氨酸分子共价相连。(d) 计算机产生的细胞色素 c 模型。蛋白质完全包围着中间的卟啉环 (浅色)。细胞色素只携带电子，而不是完整的氢原子。氧化还原的位点是铁原子，它在二价和三价的氧化状态之间变换。不同的细胞色素的还原电势变化很大 (图 5.9)，这取决于细胞色素的类型和它们结合的蛋白质。

种 Fe-S 蛋白，它具有 Fe_2S_2 结构。

Fe-S 蛋白的还原电势的范围很广，随着铁原子数和 S 原子数以及含铁中心与蛋白质相连接方式的不同而有所不同。因此在电子传递过程中，不同的 Fe-S 蛋白能在不同的位点起作用。与细胞色素一样，Fe-S 蛋白只携带电子而不携带氢原子。

在电子传递过程中，醌 (quinine) (图 5.18) 是一种高度疏水性的分子。在细菌中发现一些与维生素 K 有关系的醌，维生素 K 是高等动物的一种生长因子。与黄素蛋白一样醌接受 2 个电子和 2 个质子，但是只将电子传递到下一个载体。

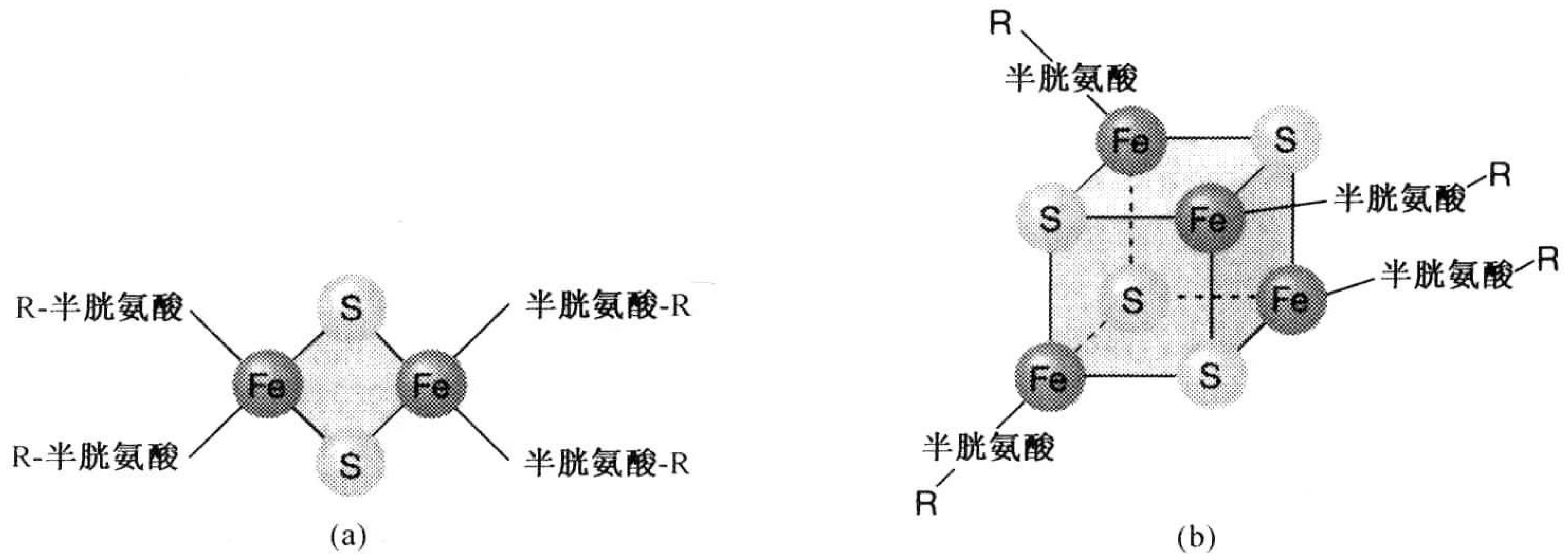


图 5.17 非血红素的 Fe-S 蛋白中 Fe-S 中心的排列。(a) Fe_2S_2 中心。(b) Fe_4S_4 中心。半胱氨酸连接是来自分子的蛋白质部分，Fe-S 蛋白是典型的只携带电子的载体。

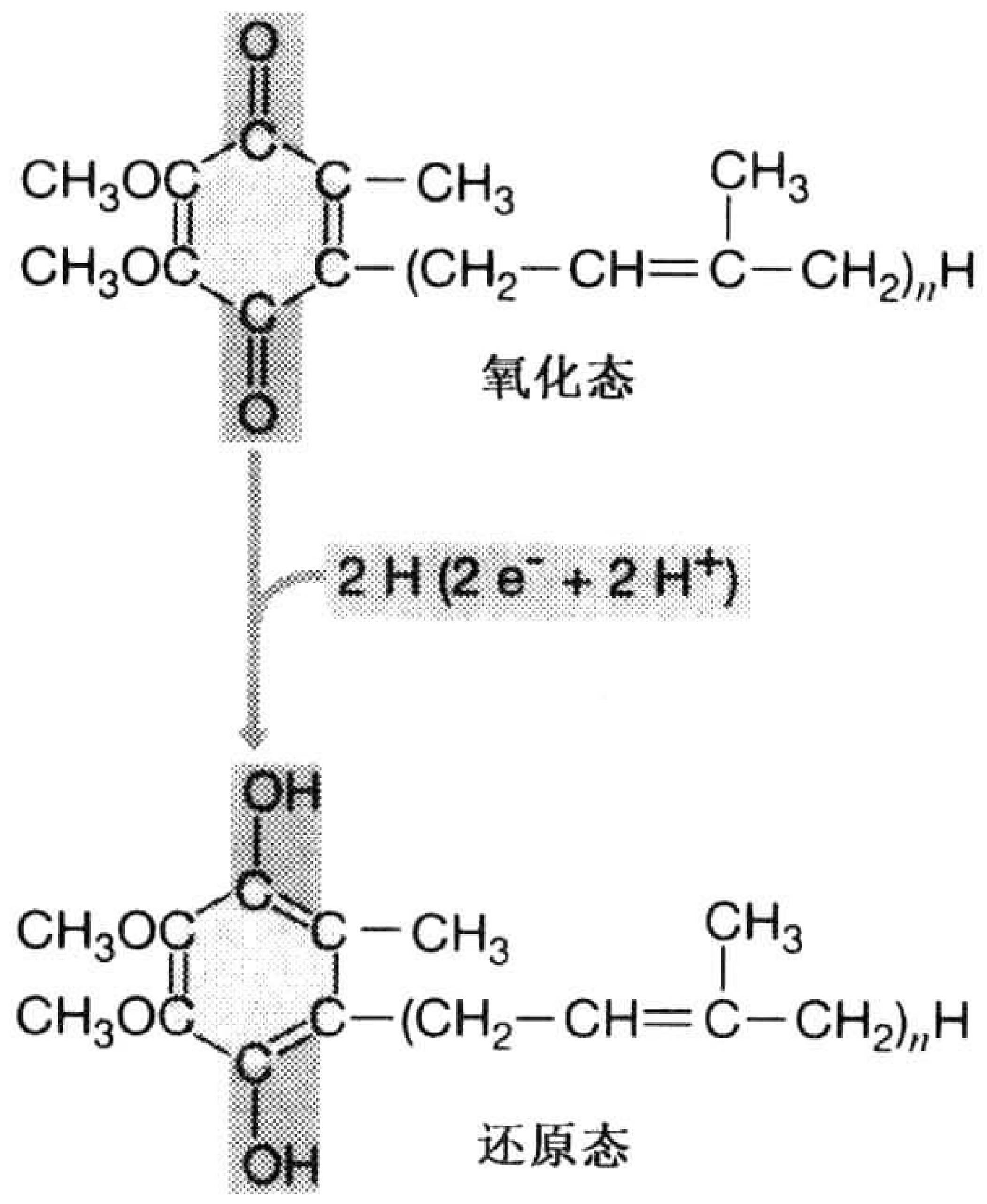


图 5.18 辅酶 Q（一种醌）的氧化和还原态结构。侧链的五碳单位出现多个重复。细菌中普遍为$n=6$；高等生物体中 $n=10$。需注意的是氧化态的醌如果被充分还原，则需 2 个电子和 2 个氢原子（2H)。半醌（比氧化态醌易被还原，只需 1 个氢原子）是在醌的还原过程中形成的，它是一种中间形式。

概念检查

电子传递系统包括了一系列的膜结合的电子传递体，这些传递体能以统一的方式将电子从最初的电子供体传递到最终的电子受体 O_2。

◆ 醌和细胞膜中的其他电子载体在作用模式上有何不同之处?

◆ 本节中表述了几种能够接受两个电子和两个质子的电子载体? 谁只能接受电子?

5.12 来自于质子动力的能量存储

图 5.19 表示电子传递链的主要成分，按照 $E_0{}'$降低的顺序排列。需要注意的是，每个成分都有自己独特的还原电势。在电子传递过程中，通过氧化磷酸化产生 ATP,

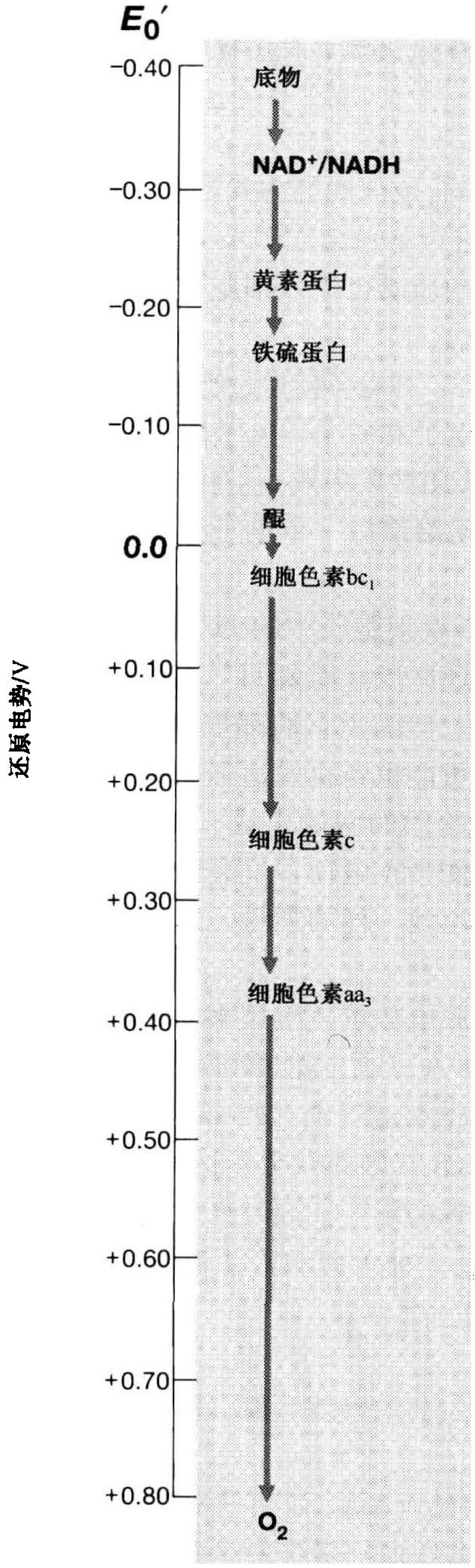


图 5.19　电子传递链及它们与 E_0' 的关系。电子传递系统的一个例子，使电子从底物传递到 O_2，这是线粒体和一些细菌［如脱氮微球菌（*Paracoccus denitrificans*）］中典型的电子传递链顺序。*E. coli* 电子传递链中缺少细胞色素 c 和 aa_3，电子直接从细胞色素 b 传递到细胞色素 o 或 d，充当终端氧化酶的角色。把完整的氧化过程分解成一系列的分解步骤，就可以通过质子动力驱动 ATP 的合成，并使能量得到储存。比较图 5.9。

ATP 的产生直接与跨膜的质子动力（proton motive force，pmf）（见 4.6 节）的产生相关联，而电子传递反应就起着使膜处于能化状态的作用。下面详细讨论此过程。

质子动力：化学渗透

要了解电子传递与 ATP 合成偶联的方式就必须首先了解电子传递系统在膜中的定位。4.5 节对膜的整体结构进行了总结（图 4.16）。由图 4.16 可以看出，蛋白质嵌入脂质双分子层中，因此许多蛋白质既可进入细胞内部又可进入细胞外部（转膜蛋白），即膜整合蛋白一般都是跨膜蛋白。

电子载体定位于细胞膜中，在电子传递过程中出现质子与电子的分离。从氢原子载体 NADH 分离出的氢被分解成电子和质子，电子被电子传递链中的特异载体传递，而质子被排到细胞外环境中（革兰氏阴性菌中质子被排到周质中），使外环境中呈微酸性。在电子传递链的末端，把电子传递给最后一个电子受体（好氧呼吸中是 O_2），并使之还原成 H_2O。

O_2被还原成 H_2O 时，需要细胞质中的 H^+ 来完成这个反应，这些质子来自水的分解：$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$。$O_2$还原成水需要 H^+，而 H^+ 的外分泌致使细胞膜内侧 OH^- 净积累。尽管它们都是小分子，但因为它们都带电荷，所以无论是 H^+ 还是 OH^- 都不可能自由地通过细胞膜，也不可能重新自发达到平衡。

因此净积累的结果是在跨膜的两侧生成 pH 梯度和电势能，即在细胞质侧带负电荷，呈碱性，而在细胞膜外侧带正电荷，呈酸性。所以跨膜的 pH 梯度和电势能（统称质子动力）赋予了细胞膜像电池一样的能量，这种电势能可以被细胞以 ATP 的形式储存起来。

电子传递过程产生的跨膜电势可直接用来做有用功，如离子运输（见 4.7 节）、鞭毛旋转（见 4.14 节）或驱动 ATP 中高能磷酸键的生成，这些将在后面详细讨论。1961 年英国科学家 Mitchell 在化学渗透理论（chemiosmotic theory）中首次提出质子动力驱动 ATP 合成这种思想，Mitchell 因此获得了诺贝尔奖，这一概念对包括发酵在内的每种形式的能量代谢产生了深远的影响。同时也对包括细菌、古生菌和真核细胞在内的所有细胞的化学渗透（chemiosmosis）过程产生影响。

质子动力的产生：复合体Ⅰ和Ⅱ

质子动力生成的关键部位与黄素酶、醌、细胞色素 bc_1 酶复合物及末端氧化酶等活性有关。

NADH 把 2 个氢原子传给 FAD，而后 FADH 把 2 个电子传给一个 Fe-S 蛋白，也把 2 个 H^+分泌出去。这种非铁血红素蛋白是膜蛋白复合体Ⅰ的一部分（图 5.20）。之所以将这些传递体称作复合体，因为每个传递体含有几种蛋白质，如大肠杆菌的复合体Ⅰ实际上含有 14 种不同蛋白质。复合体的正式名称为 NADH:醌氧化还原酶，这是因为反应的净结果是 NADH 被氧化而醌被还原。当非血红素铁蛋白复合体Ⅰ还原辅酶 Q 的时候（图 5.20）也同时从细胞质中吸收了两个来自水分解的质子。

复合体Ⅱ简单地越过了复合体Ⅰ中的这些步骤，通过 FAD/FADH 直接将电子和质子传递到醌。因为复合体Ⅱ所氧化的特殊底物——琥珀酸盐（柠檬酸循环的产物，图 5.22）而

被称作为琥珀酸脱氢酶复合体。然而，由于复合体Ⅱ越过了复合体Ⅰ，每泵出 2 个电子从此处进入电子传递链的质子数要比从 NADH 进入电子传递链的质子数要少（图 5.20）。

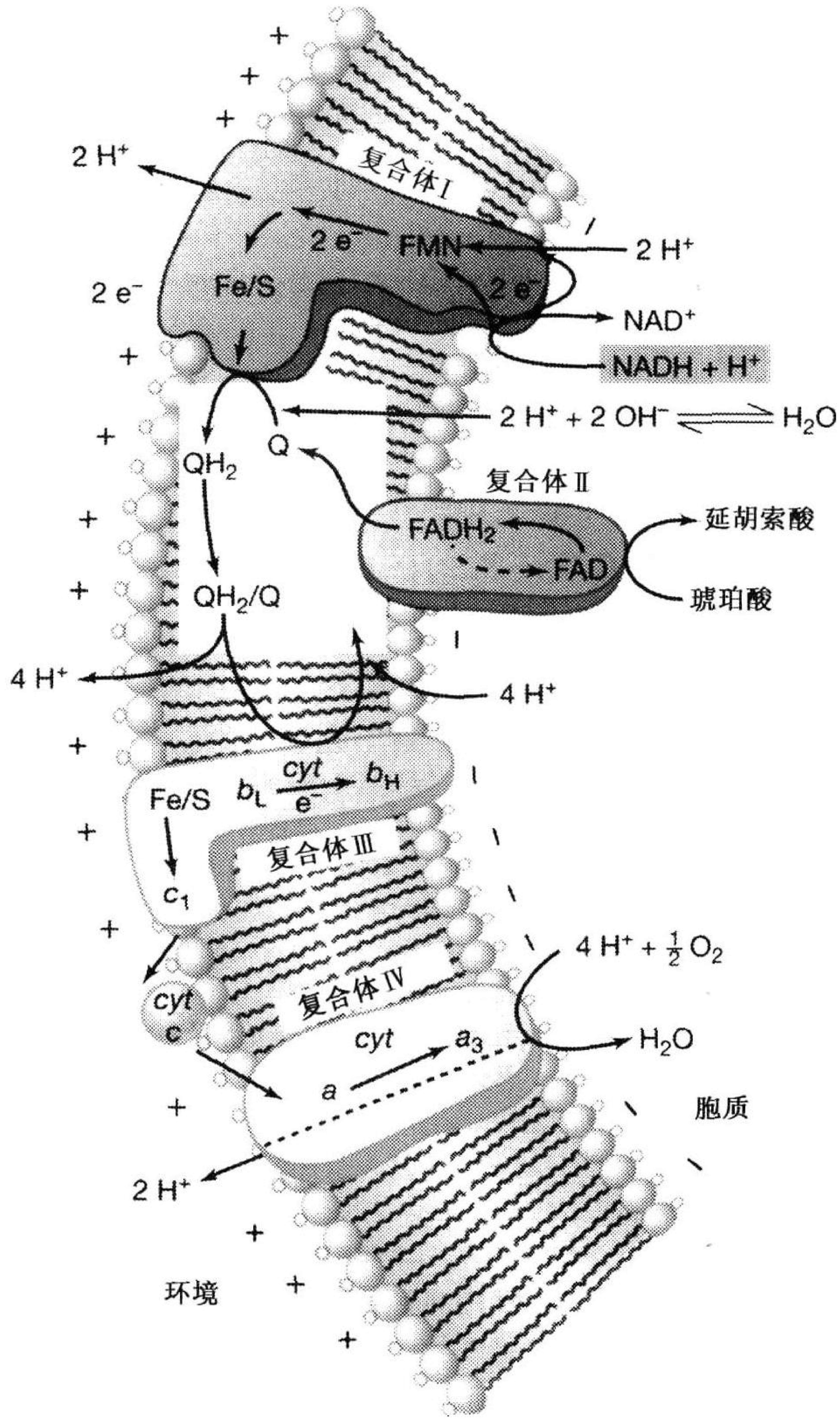


图 5.20 有氧呼吸中质子动力的产生。图表示的是电子载体在细菌（如脱氮微球菌膜）中定向排列，脱氮微球菌是研究呼吸作用的原核生物模型。来自质子（H^+）和氢氧根离子（OH^-）的正、负电荷分别在膜两侧进行积累。缩略词如下：FMN：黄素蛋白；FAD：黄素单核苷酸；Q：醌；Fe-S：铁硫蛋白；cyt a、b、c：细胞色素 a、b、c。（b_L和 b_H，低和高电势 b 型细胞色素）。Q 位点有 Q 循环中的电子传递。这是因为来自于 QH_2 电子在复合体Ⅲ的铁硫蛋白和 b 型细胞色素之间发生分裂。穿过 b 型色素的电子将 Q 还原为 QH_2，因此增加了在 Q-bc_1 位点泵出质子的数目。传递到铁硫蛋白上的电子继续将复合体Ⅳ中的细胞色素 c_1、然后是细胞色素 c 和 a 型细胞色素还原，最终将 O_2 还原为 H_2O（将 1/2 分子的 O_2 还原为水需要 2 个电子和 2 个质子。它们分别来自于细胞色素 c 和细胞质中的质子）。复合体Ⅱ，即琥珀酸脱氢酶复合体跨越复合体Ⅰ而直接将电子注入醌库中。图中所显示的复合体的数目是膜生物能学研究者所常用的。将此电子传递链与 17.37 节中的大肠杆菌电子传递链进行比较发现，生长环境的不同会明显地影响任何电子传递链中的组成成分。

复合体Ⅲ和Ⅳ：bc_1和 a 型的细胞色素

还原型的辅酶 Q 一次传递一个电子给细胞色素 bc_1复合物，如图 5.20 所示。细胞色素 bc_1复合物含有几种含血红素或者金属中心的蛋白质。这些复合物包括两种 b 型血红素（b_L和 b_H）、一种 c 型血红素（c_1）和 Fe-S 蛋白（叫做 Rieske 蛋白）。细胞色素 bc_1复合物也存在于许多能呼吸的生物体电子传递链上。细胞色素 bc_1 复合物在光和电子流动中也起着作用（见 17.4 节和 17.5 节）。

细胞色素 bc_1复合物的重要功能就是把电子从醌传递给细胞色素 c（图 5.20）。在周质中，电子从 bc_1 复合物传递到细胞色素 c，从这里传递到高电势的细胞色素 a 和 a_3（复合体Ⅳ，图 5.20）。后者是末端氧化酶，在电子传递的最后一步能将 O_2还原成 H_2O，复合体Ⅳ也能将 2 个质子泵出（图 5.20）。

细胞色素 bc_1 复合物也可以与醌作用将位于 Q-bc_1 位点的另外两个质子泵出，（图 5.20）这主要是由一系列称之为 Q 循环的电子交换过程完成。由于醌和 bc_1 复合物具有大致相同的电势 E_0'（接近 0V，图 5.19），利用从 bc_1 复合物上反馈回来的电子可以将不同的醌分子进行氧化和还原。我们没有必要知道这种机制的细节，但是通过这种机制可以使每次从复合物Ⅰ进入 2 个电子就会有 4 个质子泵出到细胞膜的外面（图 5.20）。

图 5.20 中表示的电子传递示意图仅仅是许多已知的不同生物个体的传递顺序的一种。然而，其中的一些特点是所有的传递链都具有的：①都存在着一系列的膜偶联的电子传递体，它们按照 E_0'增加的顺序排列；②电子传递链中只有电子的改变及电子和质子载体的改变；③质子动力的产生是由于跨膜电荷的分离造成，外酸内碱。

正如我们所看到的那样，质子动力的产生驱动了 ATP 的形成。

ATP 酶、质子动力和 ATP 的形成

电子传递所产生的质子动力（图 5.20）是如何用来生成 ATP 的呢？有意思的是，在 ATP 合成机制和推动细菌鞭毛转动的马达机制（见 4.14 节和图 4.56）之间存在着很高的相似性。将质子动力转化为 ATP 的催化剂是与膜结合的酶复合物，被称为 ATP 合成酶（ATP synthase），简称 ATP 酶（ATPase）。ATP 酶在整个电子传递系统中被认为是复合物Ⅴ。

ATP 合成酶含有两个重要的部分：一个是多亚基构成的头部，叫做 F_1，位于细胞膜内侧；另一个是运输质子的跨膜通道（图 5.21），叫做 F_0，此复合体酶催化 ATP 和 ADP＋Pi（无机磷）之间的可逆反应（图 5.21）。ATP 酶的结构在整个生物界高度保守，这表明能量储存机制是一个非常早的进化创造。

F_1/F_0复合体是已知的最小的生物马达。穿过 F_0亚单位的质子运动使 c 蛋白发生转动，结果产生了一种扭力，这种力量通过 $\gamma\varepsilon$ 亚单位传递到 F_1。后者导致 β 亚单位的构象变化，这种形式的势能可以被用来驱动 ATP 的形成。很可能由于 β 亚单位的构象变化使得 ADP＋Pi 结合到每个亚单位上。

ATP 的形成发生在 β 亚单位恢复到原始构象的时候。与鞭毛的马达相比（图 4.56），F_1亚单位的 $b_2\delta$ 亚单位的主要功能是起定子作用，可以防止 αβ 亚单位和 $\gamma\varepsilon$ 亚单位的转动，这样 β 亚单位的构象变化就会受到影响。但是与鞭毛不同，ATP 酶的转

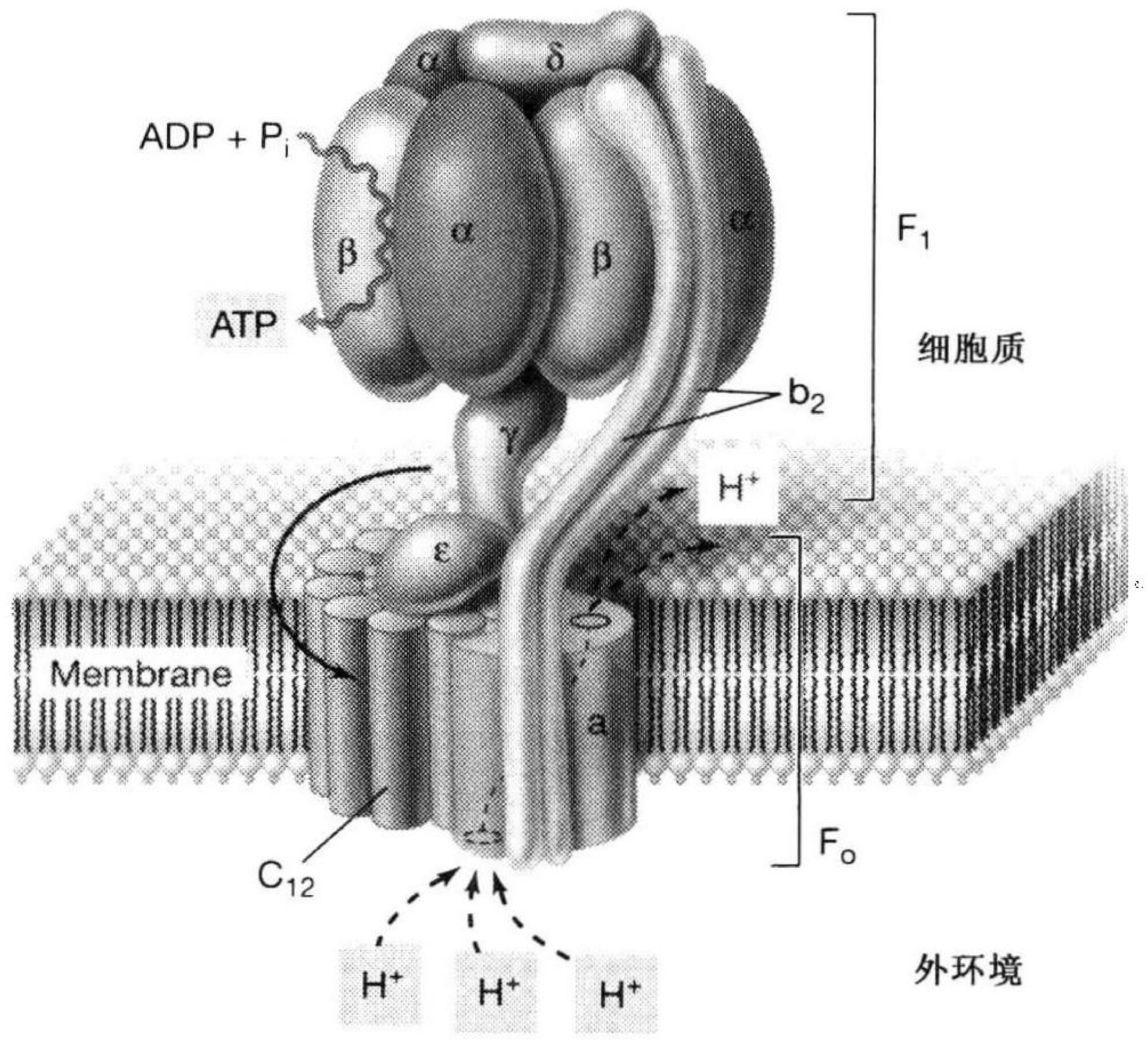


图 5.21　ATP 合成酶（ATPase，复合体Ⅳ）的结构和功能。F_1 由 5 种不同多肽 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ 组成复合体，F_1 复合体蛋白催化 ATP 和 ADP+Pi 之间内部转换。F_0 与膜结合在一起，含有 3 种多肽 ab_2c_{12}，作为质子越膜通道。亚单位 b 突出到膜外与 b_2 和 δ 亚单位一起形成定子。当质子进入后，质子动力消失，驱动 ADP+Pi 生成 ATP。ATP 酶作用是可逆的，即 ATP 的水解可以驱动质子动力的形成。

动是为了合成 ATP（图 5.21），而不是推动细胞的运动。ATP 酶催化的 ATP 合成在呼吸系统中被称之为氧化磷酸化，而在光合有机体中被称之为光合磷酸化。由 ATP 酶产生一个分子的 ATP 所消耗的质子数为 3～4。

ATP 酶的可逆性

小 F_1/F_0 分子马达是可逆的。ATP 的水解为 γ 亚单位提供能量使之向相反的方向旋转，导致质子通过亚单位从细胞内泵到细胞外。这些事件导致质子动力的产生而不是消散。ATP 酶的可逆性可以解释为什么严格发酵的有机体缺少电子传递体并且不能进行氧化磷酸化，但却产生这些复合体。细胞中很多重要的反应（如运动和运输）都需要来自于质子动力提供的能量而不是来自于 ATP 的能量（见 4.6 节）。因此，在不进行呼吸作用的有机体（如乳酸菌）中，ATP 酶在产生质子动力驱动必需的细胞活动的过程中起间接的作用。

抑制剂和解偶联剂

可以使用某些影响电子传递或者氧化磷酸化的化学物质对电子传递反应进行研究。这些化学试剂有两类：抑制剂和解偶联剂。抑制剂既可以阻止电子流动因此阻断了质子动力的形成，如 CO 和 CN^-，二者都可以紧紧地与 a 型细胞色素结合（图 5.20），从而阻断电子传递。解偶联剂是脂溶性物质，如二硝基苯酚和双香豆素，它们都可以增加膜通透性，加速了质子的跨膜渗漏，导致质子动力消失，阻断了 ATP 的合成（图 5.21）。

概念检查

电子通过电子传递链进行传递时，质子被排到膜外形成质子动力。主要的电子传递体包括核黄素、醌、细胞色素 bc_1 复合体和其他的细胞色素，这取决于不同的有机体。细胞利用质子动力通过 ATP 酶制造 ATP。

◆ 电子传递反应如何产生质子动力？

◆ 每 2 个电子通过脱氮微球菌的电子传递链排出质子的比例是多少？在传递链哪些位置建立起质子动力？

◆ 细胞中的哪些结构将质子动力转化为 ATP？它们是如何运作的？

V 呼吸作用中的碳流和代谢旁路

在理解了呼吸作用中 ATP 产生原理后，需要理解一下与 ATP 合成相关的碳代谢。同时还将简单介绍一下其他的能量产生机制，包括无氧呼吸、光合作用和化能无机营养。

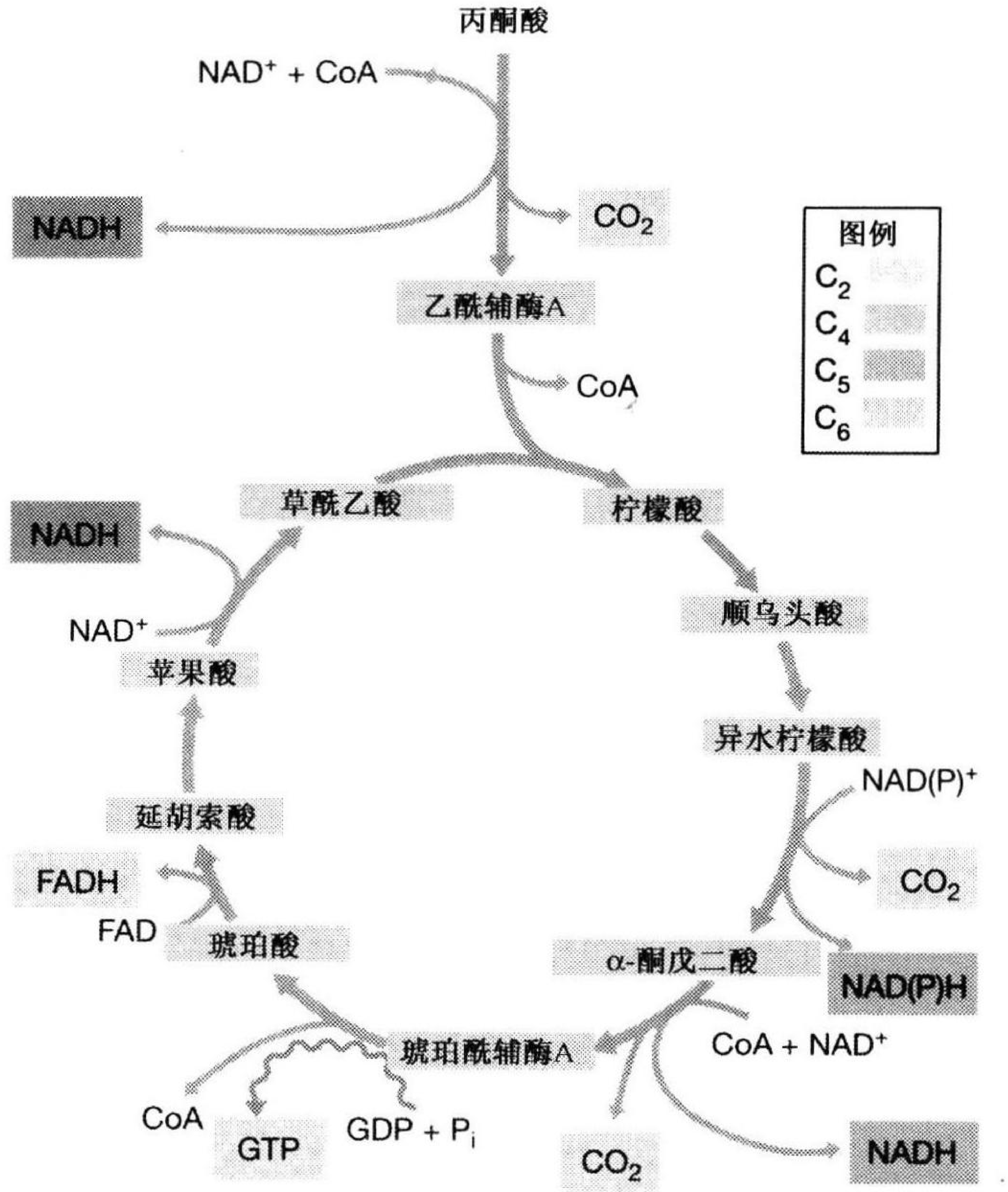
5.13 呼吸作用中的碳流：柠檬酸循环

呼吸作用中，葡萄糖最初几步代谢与糖酵解相似（图 5.14）。已经注意到糖酵解中的关键中间物质是丙酮酸。在发酵中，丙酮酸被转化成发酵产物（图 5.14），而在呼吸作用中，丙酮酸被完全氧化成 CO_2。丙酮酸被完全氧化成 CO_2 这个重要的途径叫柠檬酸循环（citric acid cycle，CAC）（图 5.22）。

丙酮酸首先被脱羧，生成 1 分子 NADH 和 1 分子与辅酶 A 偶联的乙酰基分子（即乙酰辅酶 A，图 5.12）。乙酰辅酶 A 的乙酰基与四碳化合物——草酰乙酸结合生成一个六碳有机酸——柠檬酸。高能化合物乙酰辅酶 A 中的键能就是用来驱动合成这个产物的（图 5.12）。这个产物再经过脱氢、脱羧及氧化反应，释放出 2 个外加的 CO_2 分子（图 5.22）。最后再重新生成草酰乙酸，且又可以作为乙酰基受体来完成循环。

二氧化碳的释放和电子传递产生能量

通过 CAC 循环，1 分子丙酮酸被氧化后可释放出 3 分子 CO_2，一个在生成乙酰辅酶 A 过程中释放，一个在异柠檬酸脱羧时释放，一个在 β-酮戊二酸脱羧时释放（图 5.22）。与发酵过程一样，在 CAC 的中间物质氧化过程中释放的电子也传递给了辅酶 NAD^+ 或 FAD。但是在呼吸中，NADH 和 FADH 氧化毕竟与发酵过程中氧化不同。在呼吸作用中，NADH 中的电子并不是用来还原诸如丙酮酸一类的中间物质（图 5.14），而是传递给氧或通过电子传递体系传给其他终端电子受体。因此在呼吸中，电子受体并不像在发酵中那样，这些电子受体允许葡萄糖完全被氧化成 CO_2，并释放出更多的能量（图 5.22b）。实际上，尽管在乳酸发酵或者乙醇发酵过程中氧化 1 分子葡萄糖只产生了 2 分子的 ATP（图 5.14），而在呼吸作用中氧化相同样数量的葡萄糖共产生 38 分子 ATP。



(a)

有氧呼吸的能量平衡：

(1) 糖酵解：葡萄糖+2NAD⁺+2ATP → 2丙酮酸+4ATP+2NADH+4ADP

（↓ CAC　↓ 复合体Ⅰ）

① 底物水平磷酸化
2 ADP + Pi → 2 ATP (× 2)
② 氧化磷酸化
2 NADH → 6 ATP
→ **8 ATP**

(2) **CAC**：丙酮酸+4NAD⁺+GDP+FAD → $3CO_2$+4NADH+FADH+GTP

（↓ 复合体Ⅰ　↓ 复合体Ⅱ）

① 底物水平磷酸化
1 GDP + Pi → 1 GTP
1 GTP + 1 ADP → 1 ATP + 1 GDP
② 氧化磷酸化
4 NADH → 12 ATP
1 FADH → 2 ATP
→ **15 ATP (×2)**

(3) 总计：糖酵解与CAC → 38ATP/葡萄糖

(b)

图 5.22　柠檬酸循环。(a) CAC起始于 2 个碳原子的乙酰辅酶 A 和 4 个碳原子的草酰乙酸聚合形成六碳的柠檬酸。通过一系列氧化和转变过程，六碳化合物被最终被重新转化为四碳的草酰乙酸，随着另外 1 分子的乙酰辅酶 A 的加入重新开始另外一个循环。(b) 电子传递链中 NADH/FADH 和 CAC 循环中 CO_2 生成的总体平衡。此图同时还显示出 NADH 和 FADH 进入的那些电子传递体复合体。

生物合成和柠檬酸循环

需要指出的是，柠檬酸循环除在分解反应中起关键作用以外，在生物合成中也起着同样重要的作用。这是因为 CAC 循环是由许多关键的中间产物所组成的，这些中间产物一旦在生物合成中需要就可以抽出来使用。重要的中间物是 α-酮戊二酸和草酰乙酸，它们是许多氨基酸的前体（见 5.16 节）。琥珀酰辅酶 A 用来生成细胞色素、叶绿素及其他四氢吡咯化合物中的卟啉环（图 5.16）。草酰乙酸也很重要，因为它可以转化成磷酸烯醇式丙酮酸，而磷酸烯醇式丙酮酸是葡萄糖异生的一个前体（图 5.25）。除此之外，乙酰辅酶 A 为脂肪酸的合成提供了原料。因此，可以认为 CAC 循环在细胞内担负着两个主要功能：生物产能和生物合成。糖酵解途径也有同样的功能，来自于这一途径的某些中间产物也可以被抽出来合成很多物质（图 5.26）。

概念检查

呼吸涉及对有机物的完全氧化，释放的能量要比发酵过程多很多。柠檬酸循环在这些有机化合物的呼吸作用中起主要作用。

◆ 柠檬酸循环中每消耗 1 分子的乙酸盐能释放多少分子的 CO_2和电子对?

◆ 柠檬酸循环和糖酵解一般起哪两种作用?

5.14 代谢旁路

正如第 2 章中所强调的那样，微生物多样性的核心内容是代谢途径多样性，尤其是在进化过程中用来产生 ATP 方式的多样性。在第 2 章中仅仅对化能有机营养方式进行介绍。本章将简单介绍另外的一些利用有机化合物作为能源的途径，重点介绍一下电子流和碳源代谢。

图 5.23 对除发酵和有氧呼吸外的其他机制进行了总结，包括厌氧呼吸（anaerobic respiration）、化能无机营养（chemolithotrophy）和光养（phototrophy）。

厌氧呼吸

其他的产生能量的方式是那些利用氧气以外的其他物质作为电子传递过程中电子受体的方式。与有氧呼吸比较，这些过程叫做厌氧呼吸。厌氧呼吸中使用的电子受体包括 NO_3^-、Fe^{3+}、SO_4^{2-}和一些有机化合物。由于它们处于电子塔上面的位置（这些电极对中，没有一个具有像 O_2/H_2O 电极对那样的正值）（图 5.9），使用的这些电子受体时，只有很少的能量释放出来。

但是利用这些电子受体却可以使微生物在无氧环境中进行呼吸。由于水中氧气的溶解度很低，又因为氧气是需求量很高的电子受体，因此在极端环境下厌氧呼吸是非常重要的。我们将会在 17.13 节中详细讨论厌氧呼吸。

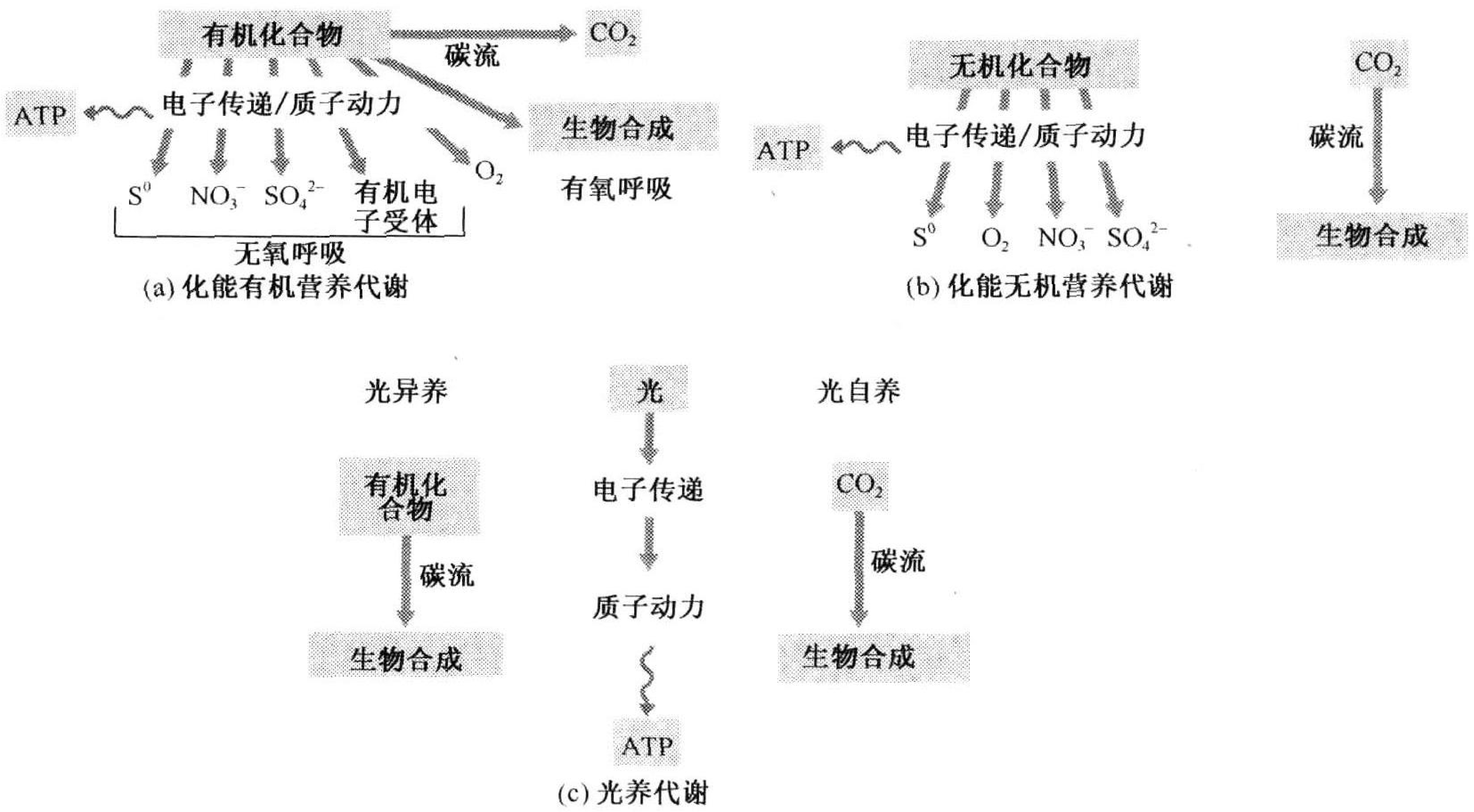


图 5.23　能量和碳源的流动。 (a) 化能有机营养代谢。(b) 化能无机营养代谢。(c) 光养代谢。注意在光养代谢中生物合成所需的碳是如何来自于二氧化碳（光能自养）或者来自于有机化合物（光能异养），同样需要注意的是在每一种情况下都是通过电子传递产生质子动力的。

化能无机营养

另一种能量产生形式是利用无机物而不是有机物。能利用无机化合物作为能源的生物体叫化能无机营养生物。无机物包括硫化氢（H_2S）、氢气（H_2）及氨（NH_3）。

化能无机营养代谢通常涉及好氧呼吸过程，但是它起始于对无机物的氧化而不是有机物（图 5.23）。化能无机营养微生物也具备像化能有机营养微生物那样的电子传递组分，并且也能产生质子动力，质子动力最终推动了 ATP 的合成。但二者之间的一个重要区别就是用于生物合成的碳源不同。化能有机营养微生物一般利用像葡萄糖那样的有机化合物作为碳源，而化能无机营养微生物则能够利用二氧化碳作为碳源，因此又叫自养生物。会在第 17 章中讨论许多形式的化能无机营养方式。

光养

许多微生物是光养型的，在光合作用中利用光作为能源。利用光作为能源的机制是独特而复杂的，但最终结果是产生了用于 ATP 合成的质子动力，这个过程叫做光合磷酸化（photo phosphorylation）。许多光养生物能利用储存在 ATP 中的能量去吸收 CO_2 进行生物合成，也称光能自养生物（photoautotroph）。而另外的一些光养生物以有机物作为碳源，以光作为能源，这种生物叫做光能异养生物（photoheterotroph）（图 5.23）。

但是如第 2 章中所了解到的那样，微生物中有两种类型的光合作用，产氧光合作用（oxygenic photosynthesis）和不产氧光合作用（anoxygenic photosynthesis）。在蓝细

菌和它的亲缘关系很近的种属中进行的产氧光合作用与高等植物的类似，最终产生氧气。而不产氧光合作用是在紫色和绿色细菌中发现的另外一种简单形式，最终不会产生氧气。这两种形式光合作用的生物能学具有很高的相似性，第 17 章中将详细加以讨论。

质子动力对改变生物能策略的重要性

微生物产生生物能的策略有惊人的多样性，上千种有机化合物、许多还原性的无机化合物及光都可以被一种或多种微生物作为能源。然而，除了在发酵过程中主要发生底物水平磷酸化以外，呼吸和光合作用中代谢的多样性主要围绕一个共同的话题展开——质子动力产生（generation of a proton motive force）。

无论电子是来自有机或无机化合物氧化，还是来自光合作用，都是越过与膜结合的电子传递链而产生质子动力的（图 5.20）。所有的能量储存过程都是通过氧化磷酸化（有机化能营养、无机化能营养）或者光合磷酸化（图 5.23），由 ATP 酶完成。

概念检查

氧气以外的电子受体可以作为最终电子受体用来储存能量。在这种情况下缺乏氧气，此过程叫做无氧呼吸。化能无机营养以无机化合物作为电子供体，而光营养生物利用光能产生质子动力。质子动力与所有形式的呼吸作用和光合作用有关。

- 化能无机营养生物和化能有机营养生物在电子供体上有何不同之处？
- 自养生物的碳源是什么？
- 光自养生物和光异养生物有何不同？

Ⅵ 生物合成

通过总结单体的生物合成来结束本章。单体是合成多聚物的基本单元，对于那些生长在没有提供这些单体的培养基或者自然界中的微生物而言，它们必须利用一些简单的成分来合成这些单体，这个过程叫做合成代谢（anabolism）。在此我们对合成代谢进行简单介绍，要注意的是合成代谢的这些过程超出了本书的范围，详细的信息可以在生物化学中找到。

合成代谢所需要的能量由 ATP 或质子动力提供（图 5.24），在分解代谢中储存在 ATP 或质子梯度中的能量在合成单体过程中及从单体形成多聚物的过程中被消耗。尽管核酸的生物合成是一个高耗能的过程，但是细胞中大量的能量消耗被用于蛋白质的合成。比较而言，只有小部分的能量被用来合成脂类和多糖。尽管这些多聚物的合成是由 ATP 或其他磷酸化合物驱动，应该注意的是如果一个细胞有足够的能量，它会通过能产生质子动力的发酵和呼吸作用很快地产生 ATP。因此，ATP 和质子动力是细胞能量的两种可以互换的形式。

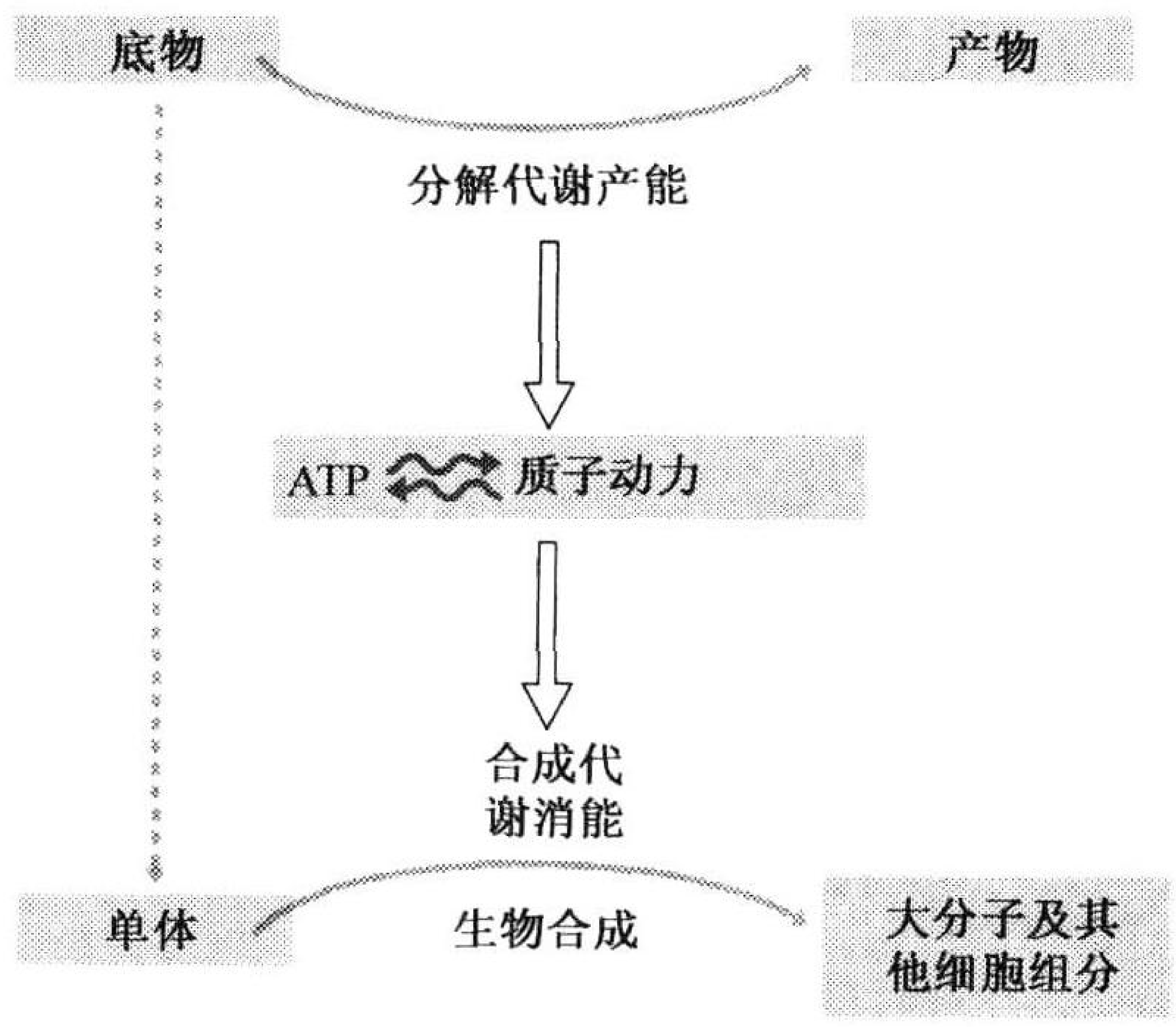


图 5.24　分解代谢和合成代谢系统。 ATP 和质子动力在整个过程中显示出关键的作用，单体可以来自于环境中作为营养物质的前体，也可以来自于分解代谢过程，如糖酵解和柠檬酸循环。很多情况下单体需要从分解代谢的中间产物中合成或者来自于自然界的可以利用的营养物质。这些生物合成过程也是分解反应。

5.15　单糖和多糖的生物合成

多糖是许多生物体细胞壁的关键成分，细菌中，肽聚糖细胞壁（见 4.8 节）含有一个多糖骨架。除此之外，细胞常以多糖形式［如糖原（glycogen）或淀粉（starch）］来储存能量（见 3.3 节和 4.13 节）。在多糖中最主要的单体是称为己糖的六碳糖（hexose），最普遍的已糖（pentose）是葡萄糖和其衍生物。除葡萄糖以外，两种称为戊糖的五碳糖在细胞中也很普遍。最明显的是核糖和脱氧核糖，分别存在于 RNA 和 DNA 骨架中。

原核生物中，多糖的合成来自于尿嘧啶二磷酸核糖（uridine diphosphoglucose，UDPG，图 5.25a）或者腺苷二磷酸核糖（adenosine diphosphoglucose，ADPG），而这都是葡萄糖的活性形式。ADPG 是合成糖原的前体，而 UDPG 是合成葡萄糖衍生物的前体，这些衍生物在细胞中被用来合成肽聚糖中的 *N*-乙酰葡萄糖胺或 *N*-乙酰胞壁酸或者是革兰氏阴性菌中外膜的磷脂多糖成分（见 4.8 和 4.9 节）。

细胞以六碳糖（如葡萄糖）为碳源时，获得葡萄糖并以此为单体合成多糖。但是当细胞以其他多糖为碳源时，就必须先合成葡萄糖。这个过程叫做糖异生作用（gluconeogenesis），以糖酵解的关键中间产物磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate）作为起始物合成（图 5.14），磷酸烯醇式丙酮酸可以从柠檬酸循环的中间产物草酸盐合成。图 5.25c 表示的是糖异生作用的总结。

五碳糖的生物合成

五碳糖是从六碳糖中移去一个碳原子（通常是以二氧化碳的形式）生成（图 5.25d）。图 5.25d 中表示出了合成核酸、核糖和脱氧核糖所需的五碳糖合成途径。核糖核苷酸还原酶（ribonucleotide reductase）催化核糖核苷酸中核糖上 2 位上的碳还原而

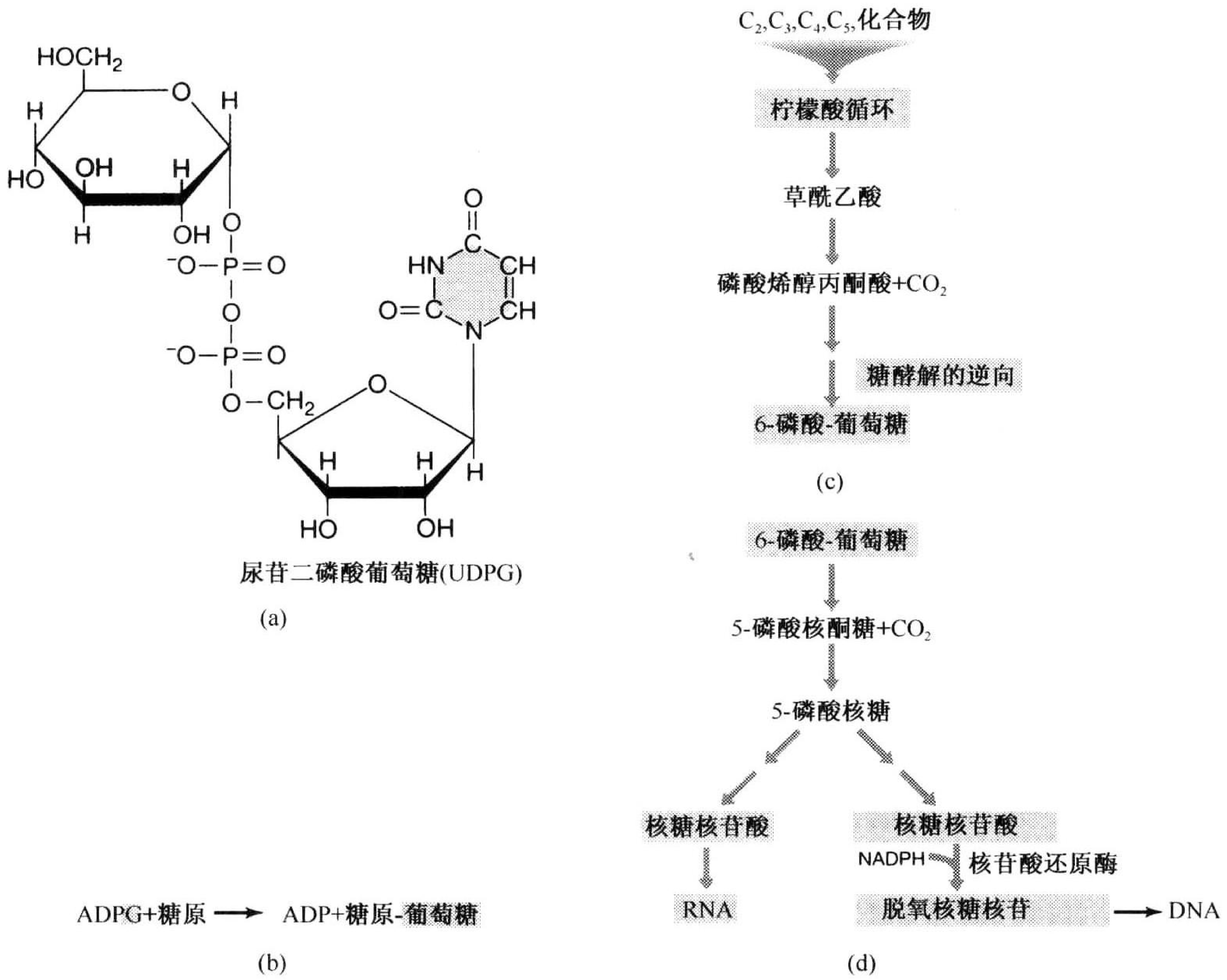


图 5.25 糖代谢。(a)多糖是由活性形式的六碳糖(如 UDPG)合成。葡萄糖用蓝色表示。UDPG 主要用来合成葡萄糖衍生物,如 *N*-乙酰葡萄糖胺。(b)糖原是以 ADPG 为单位通过不断添加葡萄糖生成。(c)糖异生作用。需要葡萄糖的时候可以通过其他含碳化合物生成,过程大体与糖酵解过程的反应相似。(d)合成核酸所需的五碳糖是通过六碳糖(如 6-磷酸葡萄糖)的脱羧获得。注意合成 DNA 的前体是如何由核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)通过 RNA 的前体合成的。

将核糖核酸转化为脱氧核糖。有趣的是,这个反应发生在合成核苷酸之前。因此,在合成核糖核酸之后,可以通过还原作用产生 DNA 合成所需的各种不同的脱氧核糖核苷酸。

概念检查

多糖是细胞的重要结构成分,是由几种前体的活化形式合成。生糖作用是通过非单糖前体合成葡萄糖。

◆ 合成糖原采用哪种形式的葡萄糖?

5.16 氨基酸和核苷酸的生物合成

生物体不能从环境中获得某些或者全部氨基酸时,就必须从其他原料来合成。根据

采用的合成步骤将氨基酸分成结构上相互关联的几类。氨基酸的碳骨架几乎都来自于糖酵解或者是柠檬酸循环的中间产物（图 5.26）。

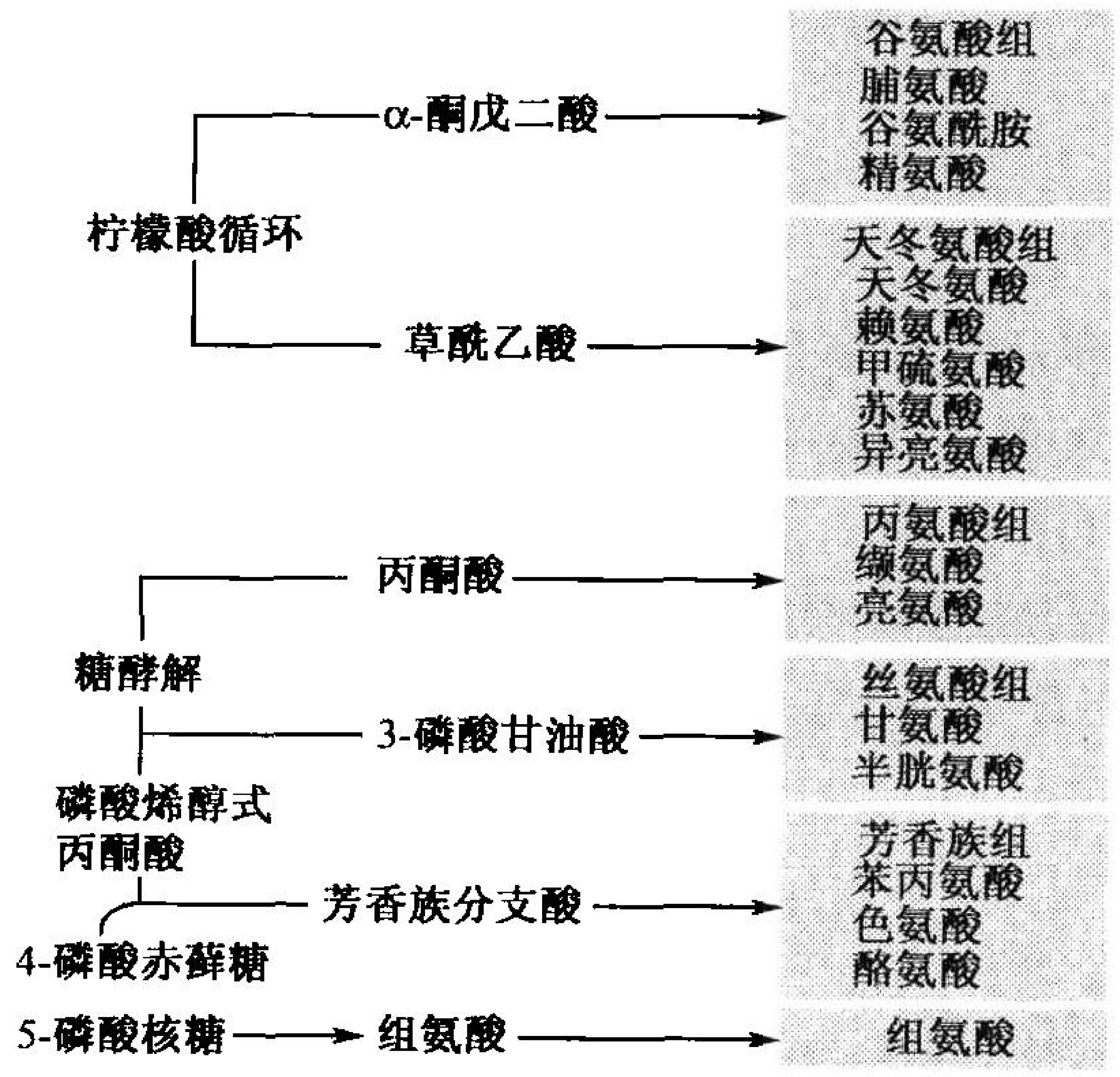


图 5.26 氨基酸家族。注意一下大部分氨基酸碳骨架是如何来自糖酵解和柠檬酸循环。一种类型的各种不同氨基酸的合成通常需要许多单独的酶催化步骤，这些步骤起始于一个氨基酸的合成（用粗体表示）。

氨基酸的氨基（amino group）通常来自于环境中的一些无机氮源，如氨气。通常是分别在谷氨酸脱氢酶（glutamate dehydrogenase）和谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase）的作用下以合成谷氨酸和谷氨酰胺的方式将氨加入到氨基酸中（图 5.27a，b）。

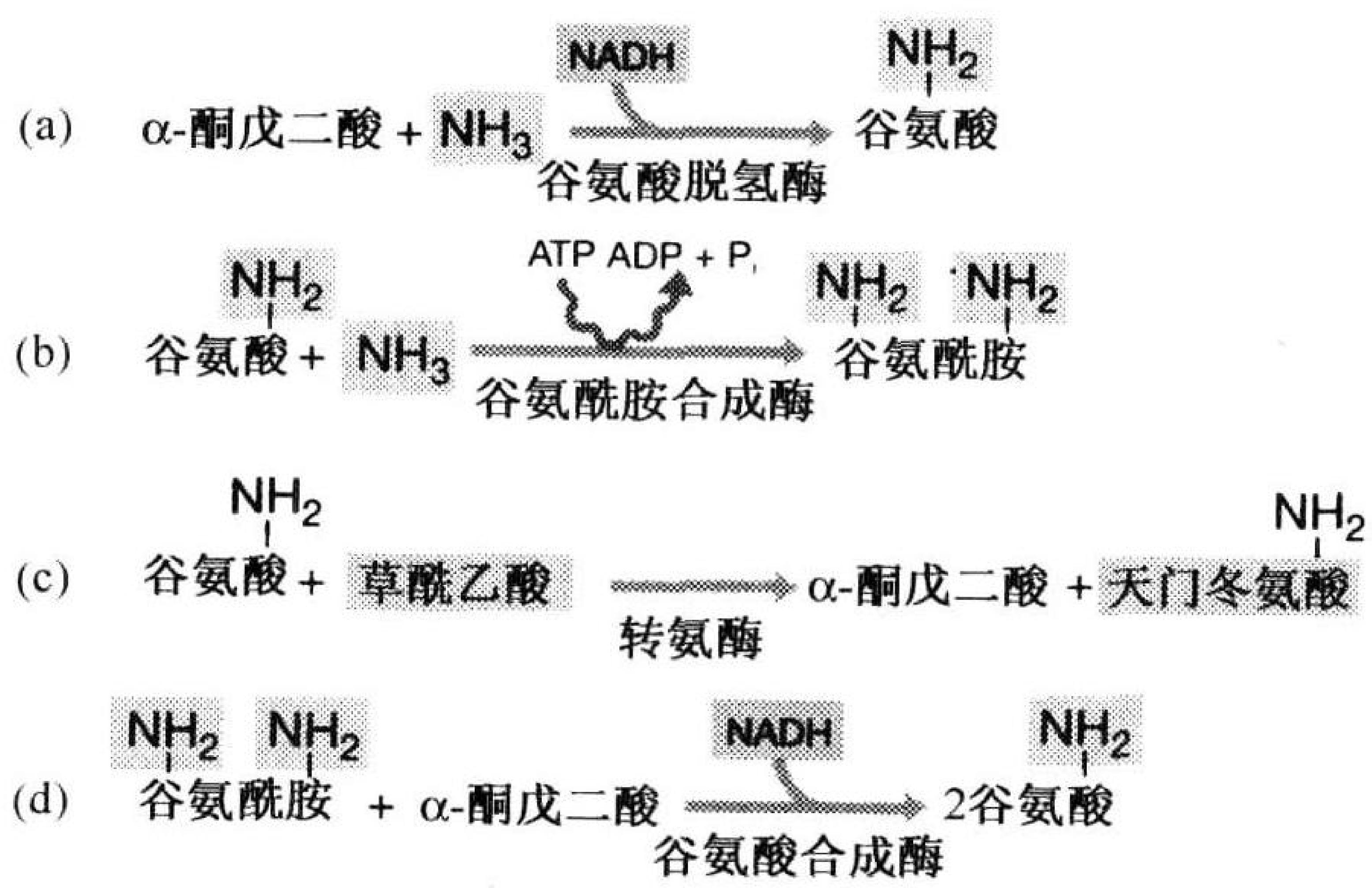


图 5.27 细菌中氨基的掺入。游离的氨和所有氨基酸上的氨基都用蓝色表示。细菌中氨的吸收有两个途径。(a) 由谷氨酸脱氢酶催化。(b) 谷氨酰胺合成酶催化。(c) 转氨酶反应仅仅将氨基基团从氨基酸转移到有机酸上。(d) 在谷氨酸合成酶催化的反应中，由1个谷氨酰胺和1个α-酮戊二酸合成2分子的谷氨酸。

一旦氨被整合到氨基酸中，就可以形成其他形式的含氮化合物，如在转氨酶（transaminase）的作用下谷氨酸可以将它的氨基基团提供给草酰乙酸形成α-酮戊二酸

和天冬氨酸（图 5.27c）。在另外一个转氨酶催化的反应中，谷氨酸可以与 α-酮戊二酸反应形成两分子的谷氨酰胺（图 5.27d），这些反应的最终结果是将氨基转移到不同的碳骨架上，在这些碳骨架上通过进一步的反应形成制造蛋白质所需的 21 种氨基酸（图 3.12）。

核酸的单体：核苷酸

嘌呤和嘧啶的合成涉及非常复杂的生物化学过程。嘌呤几乎完全是由来自于一些不同碳源和氮源的包括二氧化碳在内的原子组成（图 5.28a）。第一个关键的嘌呤——次黄嘌呤（inosinic acid）（图 5.28b）是嘌呤核苷腺嘌呤（adenine）和鸟嘌呤（guanine）的前体（图 3.9）。一旦合成这些嘌呤（以三磷酸盐的形式）并且将这些嘌呤附加在五碳糖上面，就为合成 DNA 和 RNA 做好了准备。

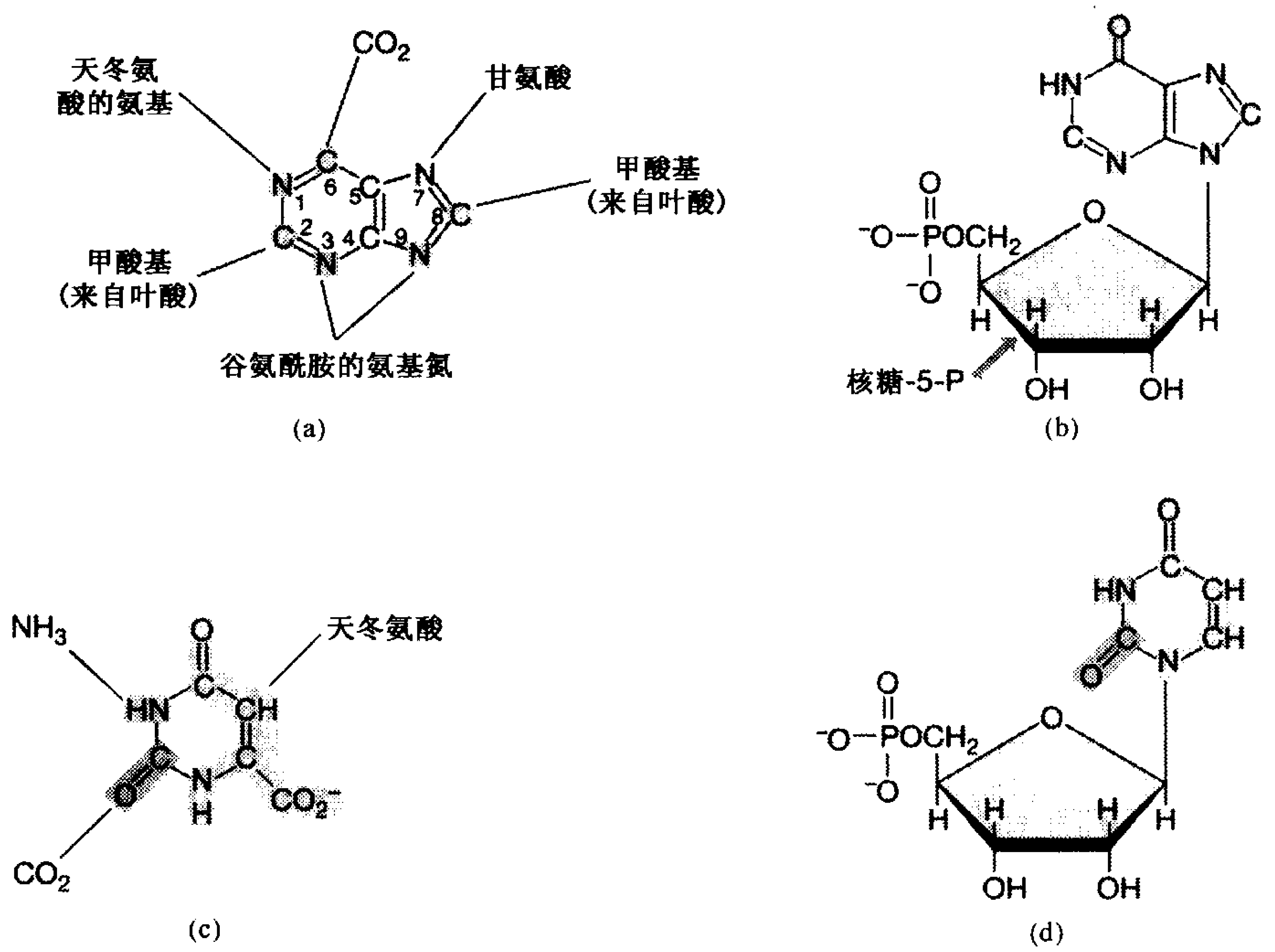


图 5.28 嘌呤和嘧啶的合成。（a）嘌呤骨架的前体。（b）所有嘌呤的前体肌苷酸。（c）嘧啶骨架的前体乳清酸。（d）所有嘧啶核苷的前体嘧啶核苷酸。嘧啶核苷酸是在乳清酸的基础上经过脱羧和加入 1 个 5-磷酸核糖合成。

与嘌呤环的合成相似，嘧啶环的合成也是由一些碳源和氮源提供原子合成的（图 5.28c）。第一个关键的嘧啶是尿苷酸盐（uridylate），其他的嘧啶［如胸腺嘧啶（thymine）、胞嘧啶（cytosine）（图 3.9）及尿嘧啶（uracil）］都是由它衍生而来（图 5.28d）。

概念检查

氨基酸是从分解代谢中产生的碳骨架合成，而核苷酸合成所需的碳原子来自于不同的途径。

◆ 哪种形式的氮源被用来合成氨基酸的氨基?

◆ 哪种碱基是嘌呤（purine)? 哪种碱基是嘧啶（pyrimidine)?

5.17 脂肪酸和脂类的生物合成

尽管古生菌脂类包含有疏水的成分而不含有脂肪酸，而细菌和真核生物则含有脂肪酸（见 4.5 节)。脂类是细胞的重要成分，就如同它们是膜的主要结构成分一样。脂类也是碳源和能源的储备。其他的脂类在细胞内部也有作用，特别是革兰氏阴性菌的脂多糖层（见 4.9 节)。一个细胞可以产生各种不同种类的脂类，其中的一些在某些情况下产生或者只在某些细胞结构中起作用。大多数的细胞中脂肪酸的合成是由一系列的反应组成。

脂肪酸合成

脂肪酸的合成是在一个称为乙酰基载体蛋白（acyl carrier protein，ACP）的小蛋白质帮助下以每次延长两个碳原子的形式合成。在合成的过程中 ACP 可以固定正在生长的脂肪酸链，而一旦合成到成熟长链就会将其释放出来（图 5.29 和图 3.7)。有趣的是，虽然脂肪酸长链每次增加 2 个碳原子，但实际上这个二碳片段是来自一个被称为丙二酸（malonate）的三碳化合物。每提供 1 个分子的丙二酰-ACP 就有 1 分子的碳原子以 CO_2分子释放出去（图 5.29)。

细胞的脂肪酸组成在不同种之间变化很大，在同一种内随着温度的改变也会有相应的变化（低温有利于短链脂肪酸的形成，而高温则有利于长链脂肪酸的形成)。细菌脂类中最常见的是含有 12～20 个碳原子的脂肪酸。

除了饱和脂肪酸、偶数碳原子的脂肪酸外还有一些不饱和脂肪酸、带有分支的脂肪酸或者是含有奇数碳原子的脂肪酸。不饱和脂肪酸在分子的疏水部分含有一个或者几个双键。双键的数目和位置通常是种属特异性的或者是基团特异性的。双键通常是通过饱和脂肪酸脱氢加入。分支脂肪酸和奇数脂肪酸是分别在分支脂肪酸和包含有丙酰基基团的基础上分别合成。

脂类

细菌和真核生物中脂类的最终组装涉及在甘油分子上加入脂肪酸。对于简单的甘油三酯，3 个甘油分子的碳源都被脂肪酸酯化。在复杂的脂类中，甘油上的 1 个碳原子上会含有 1 分子的磷酸基团、乙醇胺基团、1 分子的糖或者其他的极性分子（图 3.7)。古生菌中脂类包含植烷侧链而不是脂肪酸侧链（见 4.5 节)。与细菌和真核生物相似，古生菌的脂类中甘油的第三个碳原子也含有某种极性基团。

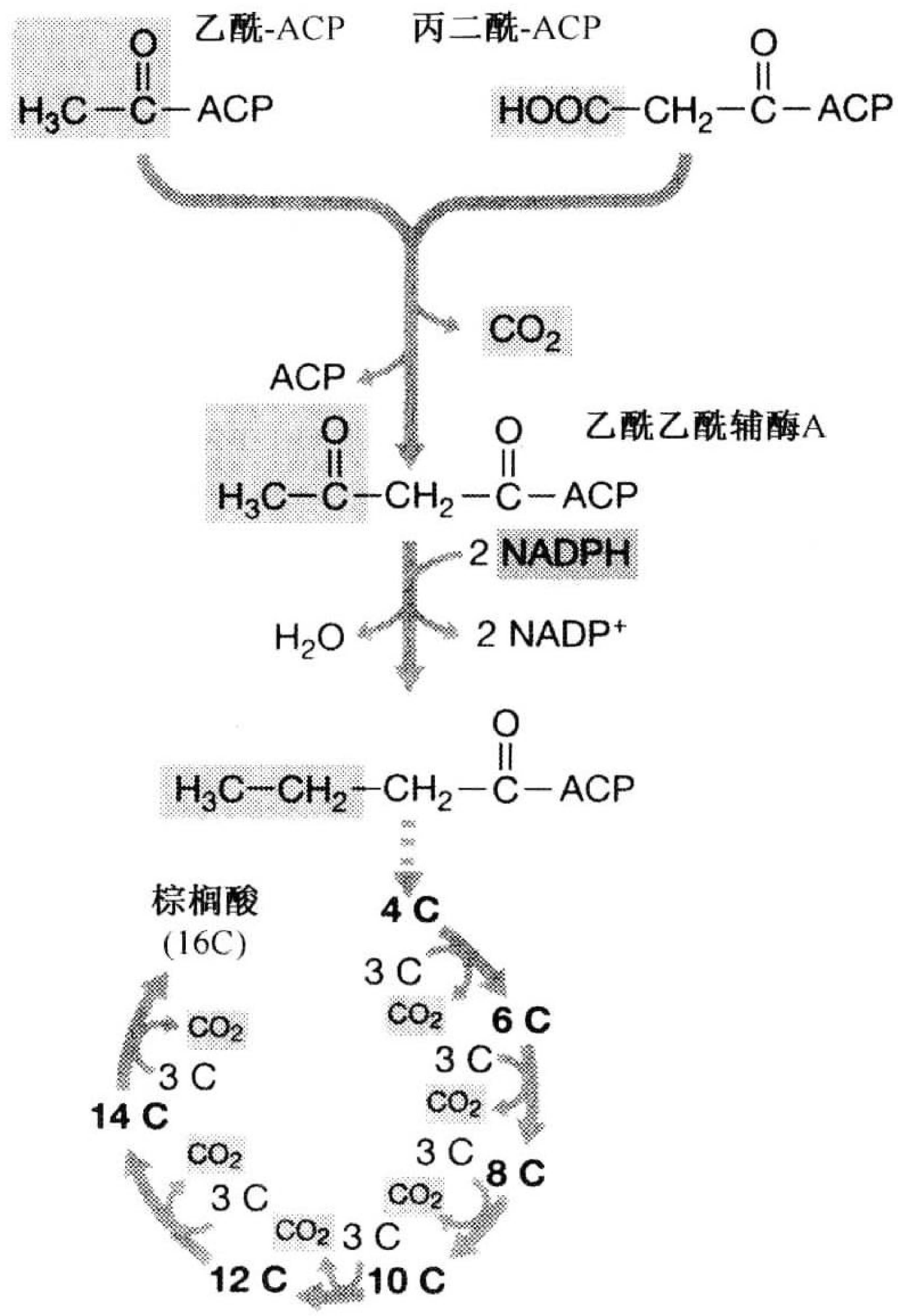


图 5.29 脂肪酸合成。显示C_{16}脂肪酸，棕榈酸的合成。乙酰-ACP 和丙二酰-ACP 缩合形成乙酰乙酰辅酶 A，每一个乙酰基的加入都来自丙二酰-ACP。

在微生物生态学研究中，脂类被用来作为生物标记，如醚键连接的脂类通常为古生菌而不是细菌和真核生物所有。其他的一些脂类对于特定种类的生物而言也高度特异，这种广泛的脂类多样性已经被用来在自然样品中检测这些生物的种类（见 11.10 节）。死亡机体上的脂类通常不容易被降解。将这种事实和脂类种属特异性结合就可以用来研究古老样品中细菌的组成。例如，对来自于湖水或者是海洋沉积物样品的脂类分析就可以追踪到在每个沉积中心的各个不同层面上的不同微生物的数量。由于每个层面都有不同的年代，这些年代可以很容易地确定，每个层面上的脂类成分就可以记录这个生境中生物的种类。

概念检查

脂肪酸是以每次两个碳原子的形式合成，然后连接到甘油上形成脂类。

◆ 请解释一下为什么在脂肪酸的合成中每次加入 2 个碳原子，而这些中间的供体含有 3 个碳原子？

复习题

1. 为什么碳和氮是常量元素而钴是微量元素？（见 5.1 节）
2. 什么是铁载体，为什么它们很重要？（见 5.1 节）
3. 为什么下面的培养基不是化学合成培养基：葡萄糖 5g、NH_4Cl 1g、KH_2PO_4 1g、$MgSO_4$ 0.3g、酵母提取物 5g、蒸馏水 1L？（见 5.2 节）
4. 何谓无菌技术，为何它很重要？（见 5.3 节）
5. 描述一下如何计算下面反应的$\triangle G^{0\prime}$：葡萄糖$+6O_2 \rightarrow 6CO_2+6H_2O$，如果有人告诉你此反应是放能反应，你预计此反应的$\triangle G^{0\prime}$是正值还是负值？（见 5.4 节）
6. 区分$\triangle G^{0\prime}$、$\triangle G$ 和$\triangle G_f{}'$。（见 5.4 节）
7. 为何细胞需要酶？（见 5.5 节）
8. 描述辅酶和辅基的区别？（见 5.5 节）
9. 下面是一系列电子供体和受体的偶联对，利用图 5.9 提供的数据将它们按照产能最高和产能最低的顺序排列：H_2/Fe^{2+}、H_2S/O_2、甲醇/NO_3^-（产生 NO_2^-）、H_2/O_2、Fe^{2+}/O_2、NO_2^-/Fe^{3+}、H_2S/NO_3^-。（见 5.6 节）
10. $NAD^+/NADH$ 的还原电势是什么？（见 5.7 节）
11. 为何乙酰磷酸是高能化合物而 6-磷酸葡萄糖则不是？（见 5.8 节）
12. 发酵和呼吸过程中如何制造 ATP？（见 5.9 节）
13. 为何在糖酵解过程中 NADH 被还原？NADH 在哪消耗？（见 5.10 节）
14. 何谓质子动力？为何此概念在生物学中如此重要？（见 5.11 节和 5.12 节）
15. ATP 酶中的旋转能量如何被用来制作 ATP？（见 5.12 节）
16. 二硝基酚和氰化物都是细胞毒剂但是作用方式不同。比较这两种物质的作用方式。（见 5.12 节）
17. 看一遍发酵和呼吸过的能量平衡表及 ATP 合成所有位点后，生物体在有氧存在情况下，代谢葡萄糖产生的 ATP 是无氧情况下的 20 倍，请用一句话解释这种区别？（见 5.13 节）
18. 为什么说柠檬酸循环在细胞内有两个重要作用？（见 5.13 节）
19. 大肠杆菌和嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus thioparus*）（一种利用硫的化能无机营养微生物）在电子供体和碳源上的区别？（见 5.14 节）
20. 哪两个分解代谢途径为糖和氨基酸的合成提供碳骨架？（见 5.15 和 5.16 节）
21. 描述脂肪酸（如软脂酸）在细胞中的合成过程？（见 5.17 节）

应用题

1. 为生物体设计一种成分确切的培养基，使它能以乙酸作为碳源和能源在有氧情况下生长，并确保能计算出生物体所需要的所有营养成分且比例合适。
2. 脱硫弧菌（*Desulfovibrio*）在厌氧情况下能以 H_2 作为电子供体，SO_4^{2-} 作为电子受体（被还原成 H_2S）进行生长。根据上面知识表 A1.2 附录 1 的数据，标明下面这

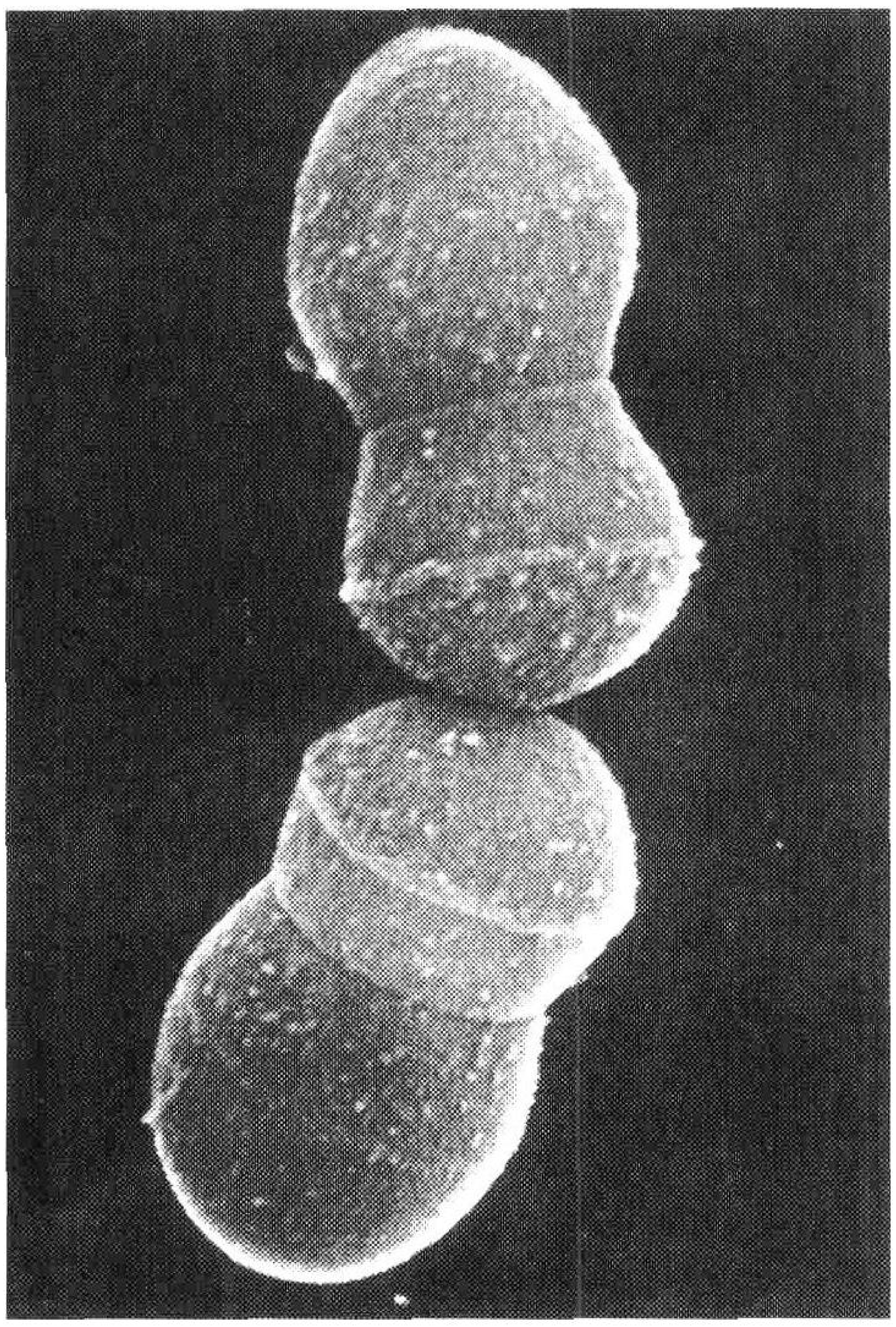
些化合物，哪一种不能在这种生物体的电子传递链中存在？为什么？细胞色素 c、泛醌、细胞色素 c_3、细胞色素 aa_3、铁氧还蛋白。

3. 利用表 A1.2 中数据，预测生物体在有氧情况下使用下列电子载体的顺序：泛醌、细胞色素 a、细胞色素 b、NADH、细胞色素 c、FAD。
4. 解释下列现象：大肠杆菌在发酵葡萄糖时，在培养基中添加 NO_3^-（产生 NO_2^-），细胞生长得较快，而当增大培养基通气量时，细胞生长得更快（已停止产生 NO_2^-）。

（魏东盛　译，徐海津　校）

6

微生物生长



细胞分裂是从一个细胞产生两个细胞的一系列过程。

词汇表

嗜酸菌（acidophile）：在较低 pH 下生长得最好的生物体
好氧菌（aerobe）：在呼吸中利用 O_2，一些生长时需要 O_2 的生物体
耐氧厌氧菌（aerotolerant anaerobe）：不能吸收氧气但有氧气存在时也不会影响生长的微生物
嗜碱菌（alkaliphile）：在高 pH 下生长得最好的生物体
厌氧菌（anaerobe）：在呼吸中不需 O_2，生长可以被 O_2 抑制的生物体
自溶（autolysis）：自发的细胞溶解现象，通常是由裂解素的作用引起
分批培养（batch culture）：在体积固定的封闭系统内培养微生物
二分裂（binary fission）：细胞扩大到体积的 2 倍后进行的细胞分裂
基本温度（cardinal temperature）：某种有机体生长的最低、最高和最适温度
恒化器（chemostat）：是一种进行连续培养微生物的装置，可以独立地控制生长速度和细胞数目
相容性溶质（compatible solute）：积累在细胞质中用于调节水活性的分子，但并不抑制生物化学过程
分裂体（divisome）：和原核生物细胞分裂相关的一种蛋白质复合物
对数期（exponential phase）：微生物生长，即在一固定的时期内，细胞数目成倍增加
极端嗜盐菌（extreme halophile）：需要高浓度盐（常大于 10%），有时需要饱和盐浓度才能生长的菌
嗜极端菌（extremophile）：在一种或几种极端的物理或化学条件（如高温、低温或低 pH）下生长得最好的微生物
兼性的（facultative）：生物体在有氧或无氧情况下都能生长
FtsZ：一种关键的细胞分裂蛋白，能够沿分裂平面形成环，促进细胞的延长
世代时间（generation time）：微生物群体细胞增殖 1 倍所需的时间
生长（growth）：细胞数目的增加
嗜盐菌（halophile）：生长需要 NaCl 的微生物
耐盐菌（halotolerant）：生长不需要 NaCl，但是可以在有 NaCl 时甚至是高浓度的 NaCl 的环境中生长的微生物
超嗜热菌（hyperthermophile）：最适生长温度为 80℃或更高的微生物
停滞期（lag phase）：对数生长期之前的那个时期，细胞正在进行代谢但还没有进行生长
嗜温菌（mesophile）：最适生长温度为 20～45℃的微生物
微好氧细菌（microaerophile）：即一个好氧生物体，只有当空气中氧分压减少时才能生长的生物体
pH：溶液中氢离子浓度的负对数
嗜冷菌（psychrophile）：最适生长温度为 15℃或更低，生长最高温度低于 20℃的生物体
耐冷菌（psychrotolerant）：能够在低温下生长，但最适生长温度高于 20℃的微生物
稳定期（stationary phase）：紧接着对数生长期，此时群体细胞生长速度降为零
嗜热菌（thermophile）：最适生长温度为 45～80℃的生物体
转肽作用（transpeptidation）：肽聚糖合成过程中胞壁酸残基之间形成的肽键连接
有活性的（viable）：有能力进行复制的
嗜干菌（xerophile）：在极干燥的环境中能生存或能很好地生存的生物

Ⅰ 细菌的细胞分裂

前三章中讨论了细胞大分子的结构（第 3 章）、细胞的结构与功能（第 4 章）及微生物营养和代谢的一般规律（第 5 章）。在开始研究大分子生物合成和微生物遗传之前（第 7 章），我们来先研究一下微生物生长。在一个细胞的生命中，生长最终的结果是一个细胞变成两个。

6.1 细胞的生长和二分裂

在微生物学中，生长（growth）一词被定义为细胞数目的增加。生长是微生物功能的重要组成方面，像任何细胞一样，自然界中的生命都是有限的，只有经过持续的群体生长，这个种属才能维持下来。然而，除了了解微生物生长的基本知识以外，在许多实际情况下需要对微生物的生长进行控制。关于群体是如何快速生长的知识对设计控制微生物生长的方法非常有用。将在第 20 章中学习这些方法。

细菌细胞本身是一个可以自我复制的合成机器。细胞生长的过程包括约 2000 种不同类型的化学反应。一些反应与能量转换有关，另一些则与小分子及酶促反应所需辅助因子和辅酶的生物合成有关，其中小分子是用来构建大分子的元件。但是，细胞的主要反应是聚合反应（polymerization），即从单体合成聚合物（大分子）的过程。一旦这些大分子物质在细胞质聚集就会生成新的结构，如细胞壁、细胞质膜、鞭毛、核糖体、包含体、酶复合物等，最终导致细胞的分裂。

二分裂

在许多原核生物中，从单细胞生长到分裂成两个新细胞的过程叫二分裂（binary fission）（表示两个细胞是来源于一个细胞）。例如，在培养大肠杆菌（*E. coli*）时可以观察到细胞延长到平均长度的 2 倍时，就生成分隔区，最后从此处分裂成两个子细胞（图 6.1）。这个分隔区就是所谓的隔膜（septum），隔膜是细胞质膜向内生长的结果，细胞壁却是向相反方向延伸，直到两个子细胞断开（图 6.1）。从定义上讲，一旦一个细胞分裂成两个，就产生了新的一代（generation）（图 6.1）。

细胞生长周期中，所有细胞组成物在数量上都增加，使每一个子细胞都能接受到一套完整的染色体和足够多的其他大分子复合体、单体和无机离子，最终使之能成为一个独立的细胞。复制的 DNA 分子在两个子细胞之间分配依赖于分裂过程中依然与膜结合的 DNA，隔膜生成也导致染色体的分离，每一套子染色体进入一个子细胞中（图 6.1）。

细菌中一个完整的细胞生长周期所需的时间是不同的，它决定于很多因素，如营养和遗传特性。在最良好营养条件下，*E. coli* 完成一个繁殖周期需 20min；有几种细菌比 *E. coli* 生长快，但多数细菌比 *E. coli* 生长慢。控制细胞分裂是一个复杂过程，且这一过程与染色体复制紧密相关。

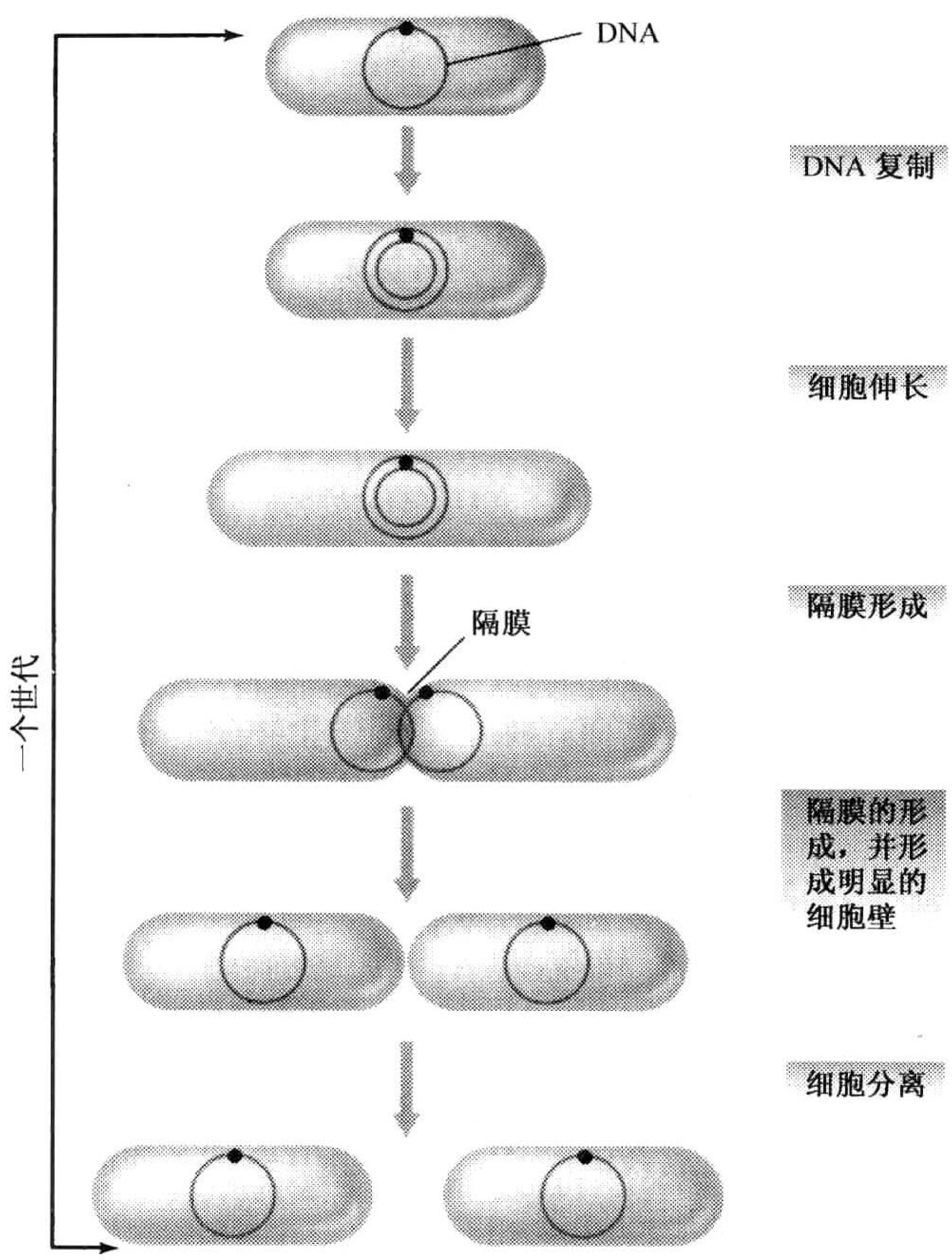


图 6.1　杆状原核生物细胞的二分裂过程。为简单起见，细胞核被描绘成一个简单的绿环。

概念检查

微生物生长涉及细胞数目的增加。大多数微生物生长是通过二分裂过程产生。

◆ 如何给“代”下一个定义?

6.2　Fts 蛋白、细胞分裂平面和细胞形态学

一些被称作 Fts 的蛋白质对于细胞分裂非常重要，缩写代表 filamentous temperature sensitive——描述的是那些有 Fts 基因突变细胞的一些特性。这些细胞很难进行细胞分裂。Fts 蛋白家族已经在大肠杆菌（*E. coli*）和其他一些细菌中进行了详细研究。

Fts 蛋白广泛分布在原核生物中，包括古生菌，在线粒体和叶绿体中也发现了 FtsZ 型的蛋白质，这进一步说明了这些细胞器和细菌之间的进化关系（见 2.3 节、14.4 节和 14.5 节）。有趣的是，FtsZ 蛋白在结构上与真核生物中非常重要的分裂蛋白微管蛋

白很相似（见 14.4 节）。

Fts 蛋白和细胞分裂

细胞中的 Fts 蛋白相互作用形成一个分裂结构（division apparatus），叫做分裂体（divisome）。杆状细胞中分裂体的形成开始于 FtsZ 蛋白分子吸附在细胞中心围绕圆柱体形成的环上（图 6.2）。这一点最终会成为细胞分裂平面。在一个大肠杆菌细胞中，大约 10 000 个 FtsZ 蛋白聚集形成了环状物，然后再吸附其他分裂蛋白（包括 FtsA 和 ZipA）（图 6.2）。FtsA 为 ATP 水解酶，为许多蛋白质组装到分裂体提供能量。ZipA 是一个固定凹，将 FtsZ 蛋白环吸附到细胞质膜上（图 6.2）。

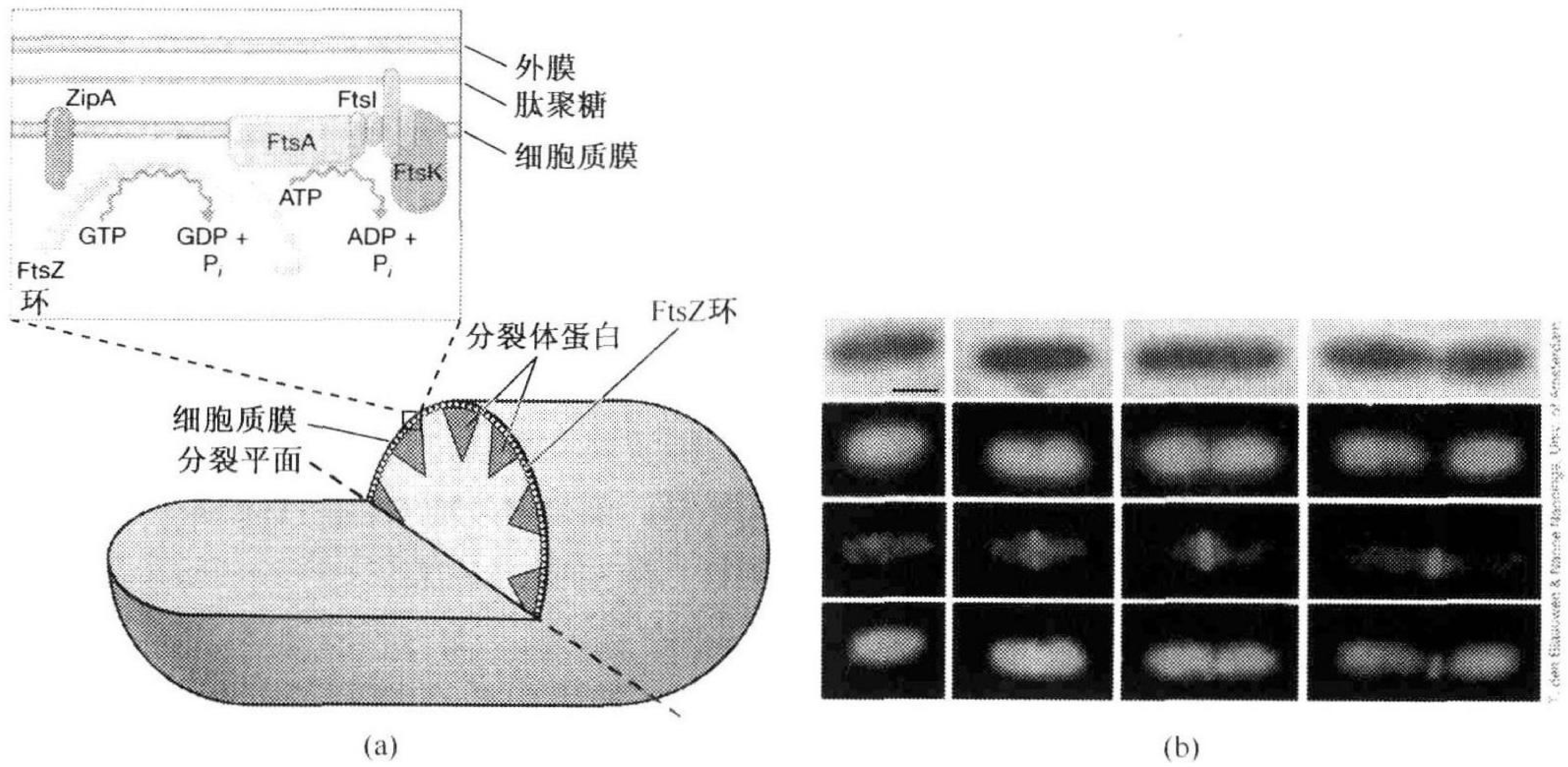


图 6.2　FtsZ 环和细胞分裂。(a) 杆状细胞的露空图里面显示围绕分裂平面形成的 FtsZ 分子环。扩大的部分显示出单个分裂体蛋白的排列。ZipA 是 FtsZ 的锚定物。FtsI 是一种肽聚糖合成蛋白。FtsK 协助染色体的分离，FtsA 是一种 ATP 酶。(b) 大肠杆菌（*E. coli*）细胞循环过程中 FtsZ 环的出现和裂解。第一排：相差显微镜照片；第二排：拟核染色；第三排：用 FtsZ 特异的染色剂对细胞染色；第四排，拟核染色和 FtsZ 染色的结合。细胞分裂过程：第一列，还没有形成的 FtsZ 环；第二列，拟核开始分裂的时候 FtsZ 环开始出现；第三列，细胞延长的时候 FtsZ 环完全形成；第四列，细胞分裂和 FtsZ 环的裂解。上面左图的标记尺度为 1μm。

分裂体还涉及与肽聚糖合成相关的蛋白质，如 FtsI 蛋白（图 6.2）。FtsI 蛋白被称作青霉素结合蛋白（penicillin-binding protein），因为它的活性可以被青霉素阻断（见 6.3 节）。分裂体使两个方向上的细胞质膜和细胞壁物质的合成互相配合，直到细胞的长度达到原始长度的 2 倍。此后，如图 6.1 所示，细胞发生收缩形成隔膜，最终形成两个细胞。

DNA 复制和细胞分裂

DNA 复制发生在 FtsZ 环形成之前。实际上，DNA 合成的终止似乎是 FtsZ 环形成的信号。环在已经复制拟核之间的空间形成。FtsZ 所确定的真实细胞的中点是在一系列称作 Min 蛋白的帮助下完成的，尤其是 MinC 和 MinE 蛋白。MinC 蛋白是细胞分裂

的抑制剂，它在细胞找到精确的中心之前阻止 FtsZ 环的形成。MinE 是 MinC 活力的抑制剂，它能将自己吸附在细胞的中心。这一过程激发了 FtsZ 的募集和分裂体的起始。

随着细胞的延长，两个拷贝的染色体被分开，分配到两个子细胞中（图 6.1）。一种称作 FtsK 的蛋白质和一些其他蛋白质在此过程中起到协助作用（图 6.2），收缩发生的时候，FtsZ 开始解聚，引发了细胞壁的向内生长最终导致两个子细胞的分离。FtsZ 具有酶的活性，可以水解 GTP 产生 FtsZ 聚集和解聚所需的能量，最终为 FtsZ 环的组装和解组装提供能量（图 6.2）。

正常行使功能的 FtsZ 蛋白对于细菌细胞分裂过程非常关键。最近出现了很多关于细胞分裂的新信息，基因组的研究证实 FtsZ 蛋白在很多系统分支中是高度保守的。在细胞水平上理解细菌细胞分裂非常有趣，不仅仅是由于基础理论原因，还由于这些理解将会导致一些新的药物产生，这些药物作用的位点就是细胞分裂中某些特定的步骤。与青霉素（一种以细胞壁为作用靶点的药物）一样，能够干扰特定 FtsZ 蛋白和其他细菌细胞分裂蛋白的药物，在临床上会非常有用。

细胞形态和原核生物的肌动蛋白类似蛋白

尽管 FtsZ 在细胞分裂过程中起主要作用，而哪些因素会影响原核细胞的形态学呢？很多年来人们一直认为肽聚糖以某种形式合成后能决定细胞形态。现在人们已经清楚地知道，在原核细胞中有特定的蛋白质决定细胞形态，而肽聚糖在其中只起到了很小的作用。有趣的是，这些形态决定蛋白与真核细胞中一种主要的骨架蛋白——肌动蛋白有着很高的相似性（见 14.4 节）。

原核生物中主要的形态决定蛋白叫做 MreB。这种蛋白质在细菌可能也在古生菌中形成了类似肌动蛋白的细胞骨架。MreB 在细胞内表面下面形成了丝状的螺旋形条带，这些条带正好位于细胞质膜下面。也许 MreB 骨架通过某种形式对细胞质膜施加力量的方式决定细胞的形态。有趣的是，球形细胞中缺乏 MreB 蛋白和基因。这表明，细菌默认的形态是球形。非球形细菌中 MreB 丝状物的重新排列可能与各种不同原核生物的细胞形态相关（见 4.11 节）。

原核细胞会产生一些结构上分别与微管蛋白和肌动蛋白相似的 FtsZ 和 MreB 蛋白，微管蛋白和肌动蛋白在真核细胞中与细胞分裂和内部细胞骨架的形成相关。由于细胞分裂对细胞生物学的重要性，真核细胞所采用的形态决定和细胞分裂的方法在原核细胞中能找到进化根源。与细胞中的其他核心功能（如 DNA 复制、转录、翻译）类似，细胞分裂机制在微生物进化中处于非常早的位置。

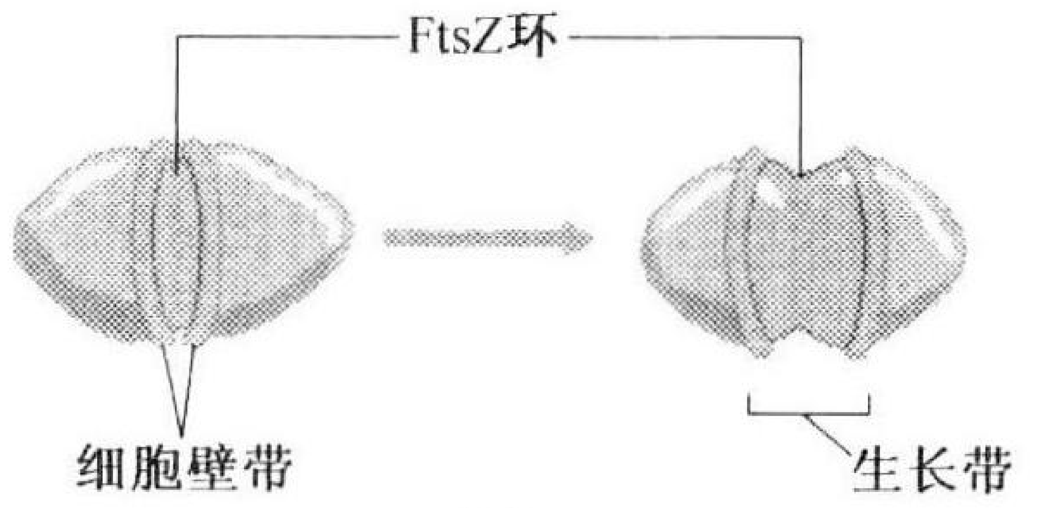
概念检查

细胞分裂和染色体复制相互协调，FtsZ 蛋白是这些过程的关键蛋白。在原核细胞中，它能确定细胞分裂平面而 Mre 蛋白则能帮助其确定细胞形态。

- ◆ 二分裂过程中，细菌染色体何时复制？
- ◆ FtsZ 如何找到细胞中点？
- ◆ 真核蛋白质中哪些与 FtsZ 和 MreB 蛋白相似？

6.3 肽聚糖合成与细胞分裂

细胞分裂之前必须形成新的细胞壁。最重要的是，新的细胞壁物质必须在没有破坏现有细胞壁完整性的前提下加入到其中。这个关键的过程在图 6.3 中表示出来。



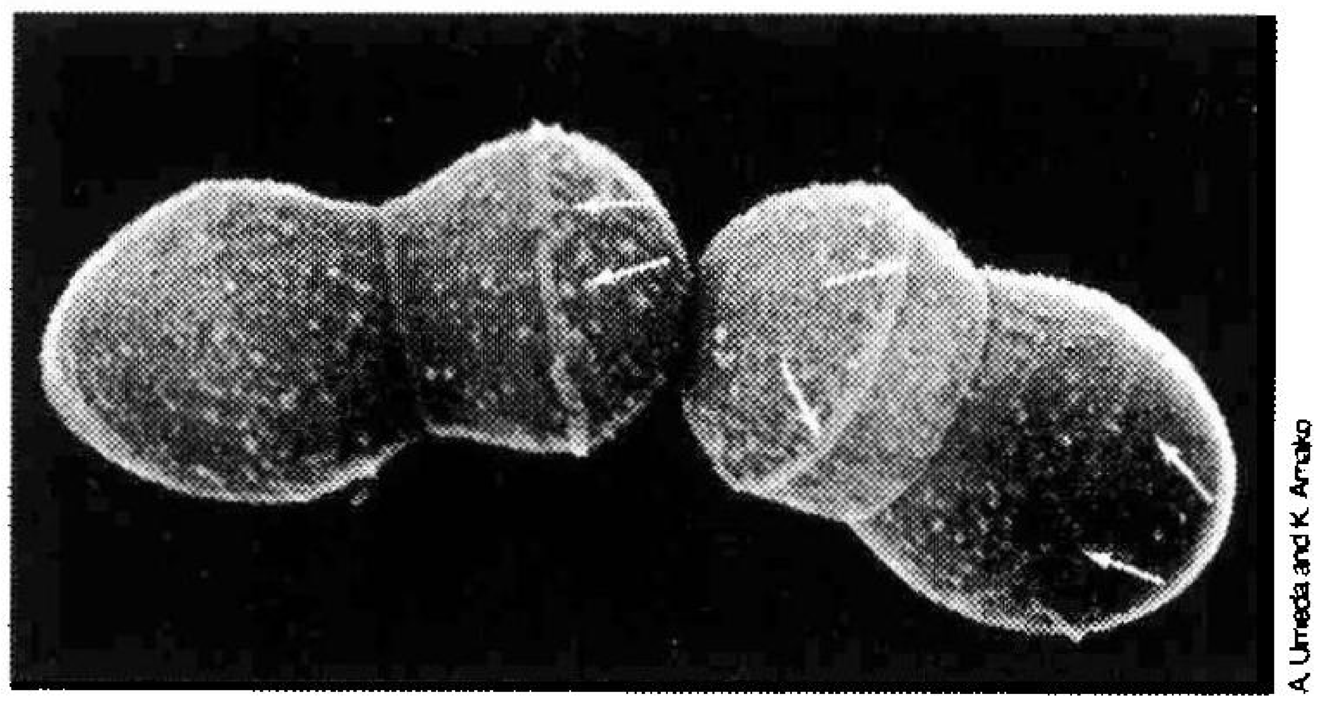


图 6.3　革兰氏阳性菌中细胞壁合成。(a) 细胞分裂过程中新细胞壁合成的部位。球形菌中，新细胞壁的合成（以绿色表示）被定位在一点上。FtsZ 环（图 6.2）决定了细胞分裂平面。(b) β-溶血性链球菌（*Streptococcus hemolyticus*）的扫描电镜照片，箭头表示出了细胞壁。单个细胞的直径大约为 1μm。

从 FtsZ 环（图 6.2a 和图 6.3）开始，在和溶菌酶具有类似功能的酶自溶素(autolysis)的作用下会在细胞壁上产生一些小孔（图 4.8）。自溶素存在于分裂蛋白复合体中。新细胞壁物质通过这些小孔加入（图 6.3a）。革兰氏阳性菌表面新旧肽聚糖的连接处形成了一个类似于疤痕的桥（图 6.3b）。肽聚糖合成过程中新的细胞壁物质（胞壁酸/葡萄糖胺/四肽单位，图 6.5）以相互协调的方式掺入到现有肽聚糖中是必需的，这种相互协调可以防止结合点上肽聚糖完整性的破坏。如果没有这样的相互协调，就会发生称作自溶（autolysis）的细胞裂解。

肽聚糖的合成

第 4 章中讨论了肽聚糖的一般结构（见 4.8 节）。肽聚糖可以看成是一种力量承受纤维，与一层橡胶类似。生长过程中新肽聚糖的合成需要通过自溶素的作用切割现有的肽聚糖同时加入肽聚糖前体。一种称作细菌萜醇（bactoprenol）的脂类载体在这个过程中起重要作用（图 6.4），细菌萜醇是一种疏水性很高的 C_{55} 醇，通过共价键的方式结合到 *N*-乙酰葡萄糖胺/*N*-乙酰胞壁酸/五肽前体上（图 6.5a）。细菌萜醇通过提供给肽聚糖前体足够的疏水性而使它们能通过细胞质膜。一旦到达细胞周质空间，细菌萜醇与能够将细胞壁前体插入到正在生长的细胞壁的酶起作用，催化糖苷键的形成（图 6.5b）。

转肽作用：青霉素作用位点

细胞壁合成中的最后一步叫做转肽作用（transpeptidation）。这个过程涉及相邻糖链之间的胞壁酸残基肽键的形成（见 4.8 节和图 4.29 及图 4.30）。转肽作用在医学上很值得一提，因为这是青霉素（penicillin）的作用位点。已经从革兰氏阴性菌的周质空



图 6.4 细菌萜醇（二磷酸十一萜烯醇）。这个高度疏水的分子能将肽聚糖前体运送穿过细胞质膜。

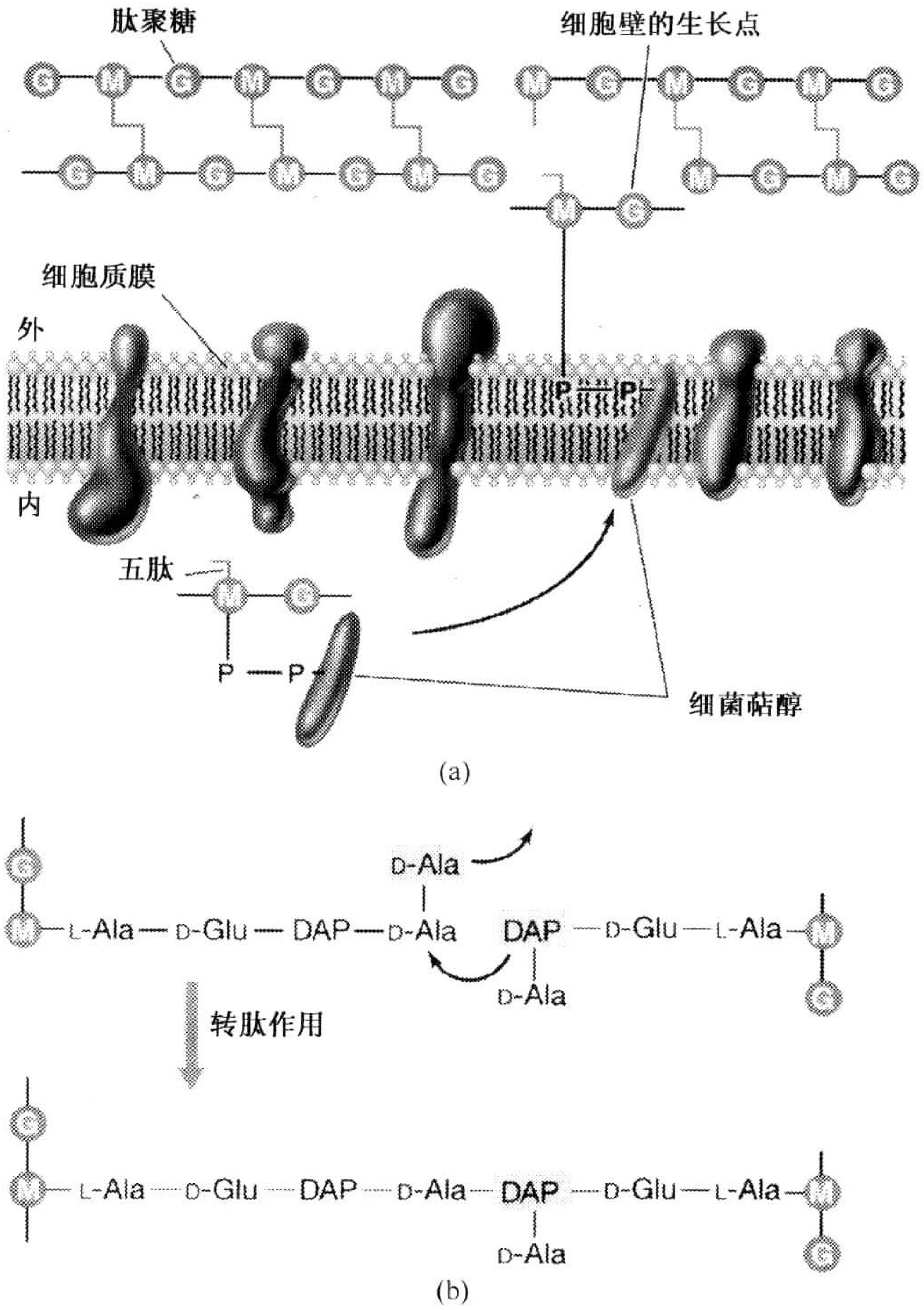


图 6.5 肽聚糖合成。（a）肽聚糖前体穿越细胞质膜到达细胞壁的生长点。（b）转肽作用导致两个相邻肽链之间最终连接的形成，青霉素抑制此反应。外和内代表环境和细胞质。

间鉴定了一些青霉素结合蛋白，包括前面提到的 FtsI 蛋白（图 6.2a），青霉素结合到这些蛋白质上后就失去了活性。在没有新细胞壁合成的情况下，自溶素的持续作用会削弱细胞壁导致细胞裂解。青霉素在医学上被广泛应用有两个原因：①人类是真核生物，缺乏肽聚糖，可以大剂量地使用青霉素。②所有的病原细菌都包含有肽聚糖，因此可以作

为潜在的作用位点。

转肽作用涉及几个氨基酸残基中某个氨基酸肽键的形成，肽键的位置由所涉及的有机体细胞壁结构决定。革兰氏阴性菌［如大肠杆菌（*E. coli*）］的肽键形成通常发生在1条肽链的二氨基庚二酸和相邻一条肽链的D-丙氨酸之间（图6.5b）。开始的时候在肽聚糖的末尾有2个D-丙氨酸，但其中的一个在转肽作用中被去除（图6.5b），为反应的向前进行提供了能量（转肽作用发生在细胞质膜外，那里没有ATP可以利用）。大肠杆菌（*E. coli*）中FtsI蛋白（图6.2a）在转肽作用中起关键作用。革兰氏阳性菌中，通常存在着一个甘氨酸桥键（见4.8节和图4.31），这种连接通过一条肽链的L-赖氨酸和另外一个肽链的D-丙氨酸实现。

概念检查

新细胞壁的合成是通过在细胞生长过程中在已经存在的细胞壁物质中添加新的糖单位实现的。高度疏水的细菌萜醇促进糖单位穿过细胞质膜成为正在生长的细胞壁的一部分。转肽作用将细胞壁前体物质结合到肽聚糖纤维上。

◆ 什么是自溶素？为什么自溶素是必需的？

◆ 细菌萜醇的作用是什么？

◆ 什么是转肽作用，为什么转肽作用很重要？

Ⅱ 细菌群体的生长

正如我们提及的那样，生长定义为微生物细胞在群体水平上增加，现在我们来进一步研究细菌群体水平上的生长动态。

6.4 生长术语和对数生长的概念

细胞分裂周期中，所有的结构组成物都成倍增加。从一个细胞生成两个细胞叫世代，而需要的时间叫世代时间（generation time）（图6.1）。因此，世代时间也就是细胞群体增加1倍所需的时间。由于这个原因，世代时间有时也被称为倍增时间（doubling time）。

不同的生物体世代时间有很大变化。一般来讲，多数细菌世代时间要比真核生物的世代时间要短。某种生物的世代时间非常依赖于所使用的培养基和培养条件。许多细菌世代时间为1～3h。但有少数繁殖非常迅速的生物体世代时间仅为10min，而有些细菌世代时间为几小时或几天。

自然界中，微生物的世代时间要比实验室中的长。这是因为自然界中对某个个体而言，最适生长温度只是在某些时候才能间断地获得。因此，自然界中的细菌群体，每几周才倍增一次，有的甚至等更长时间，这取决于资源的可利用性、物理化学条件（温度、pH等因素）、湿度和季节变化。

对数生长

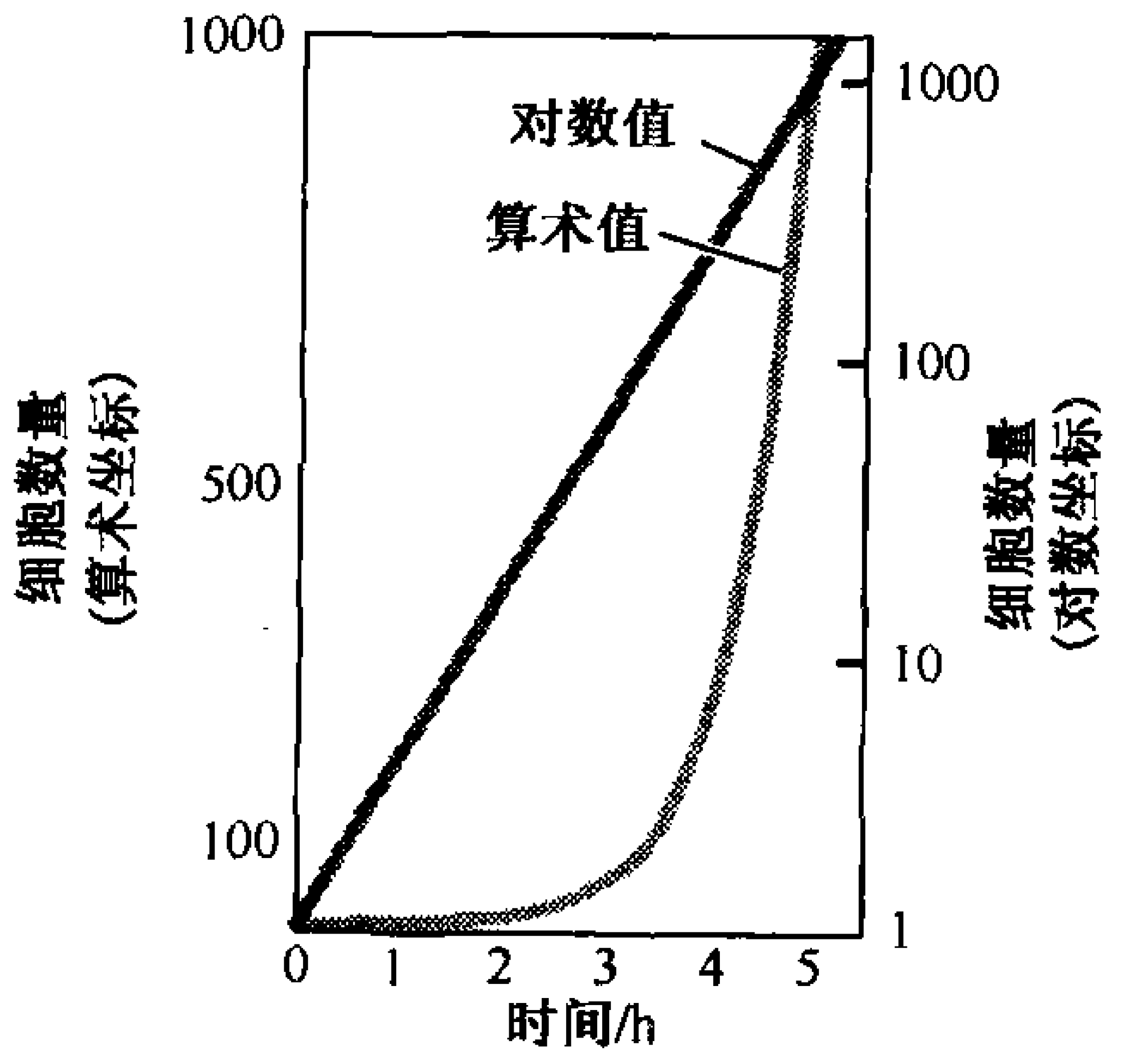
图 6.6 表示一个细胞的生长实验，世代时间约 30min。在每单位时间内，细胞数目都增倍。这样一个群体细胞生长图形就是所谓的对数生长（exponential growth），把这个实验中得到的细胞数目，以算术值作纵坐标，消耗时间作横坐标作图时，就可得到斜率持续增加的曲线（图 6.6b）。

在图 6.6b 中，以细胞数目的自然对数值作纵坐标，而以时间的算术值作横坐标（半对数图），这样就可得到一条直线。直线作用就像一个快速显示器一样，立即就能表明细胞是以对数生长。从这样的半对数图形上估计世代时间也很方便和简单。从图形上可以直接读出倍增时间（图 6.7 和图 6.12b）。

对数生长的一个特征就是在开始阶段细胞数目增加速度慢，但很快就会以相当快的速度增加。这样的结果就是在指数后期细胞数目会暴发性地增加。例如，在图 6.6 中，前 30min 内的速度是每 30min 一个细胞，然而在 4～4.5h，细胞以惊人的速度产生，约 256 个细胞/30min（图 6.6）。对数生长的一个实际例子就是将没有经过灭菌的营养丰富的食品（如奶制品等）在有利于细菌生长的条件下放置，在对数

细胞总数	时间/h	细胞总数
1	4	256 (2^8)
2	4.5	512 (2^9)
4	5	1024 (2^{10})
8	5.5	2048 (2^{11})
16	6	4096 (2^{12})
32	.	.
64	.	.
128	10	1 048 576 (2^{19})

(a)



(b)

图 6.6 微生物的生长速率。 (a) 每 30min 增加一倍的数据。(b) 数据的算术图（左纵坐标）和对数图（右纵坐标）

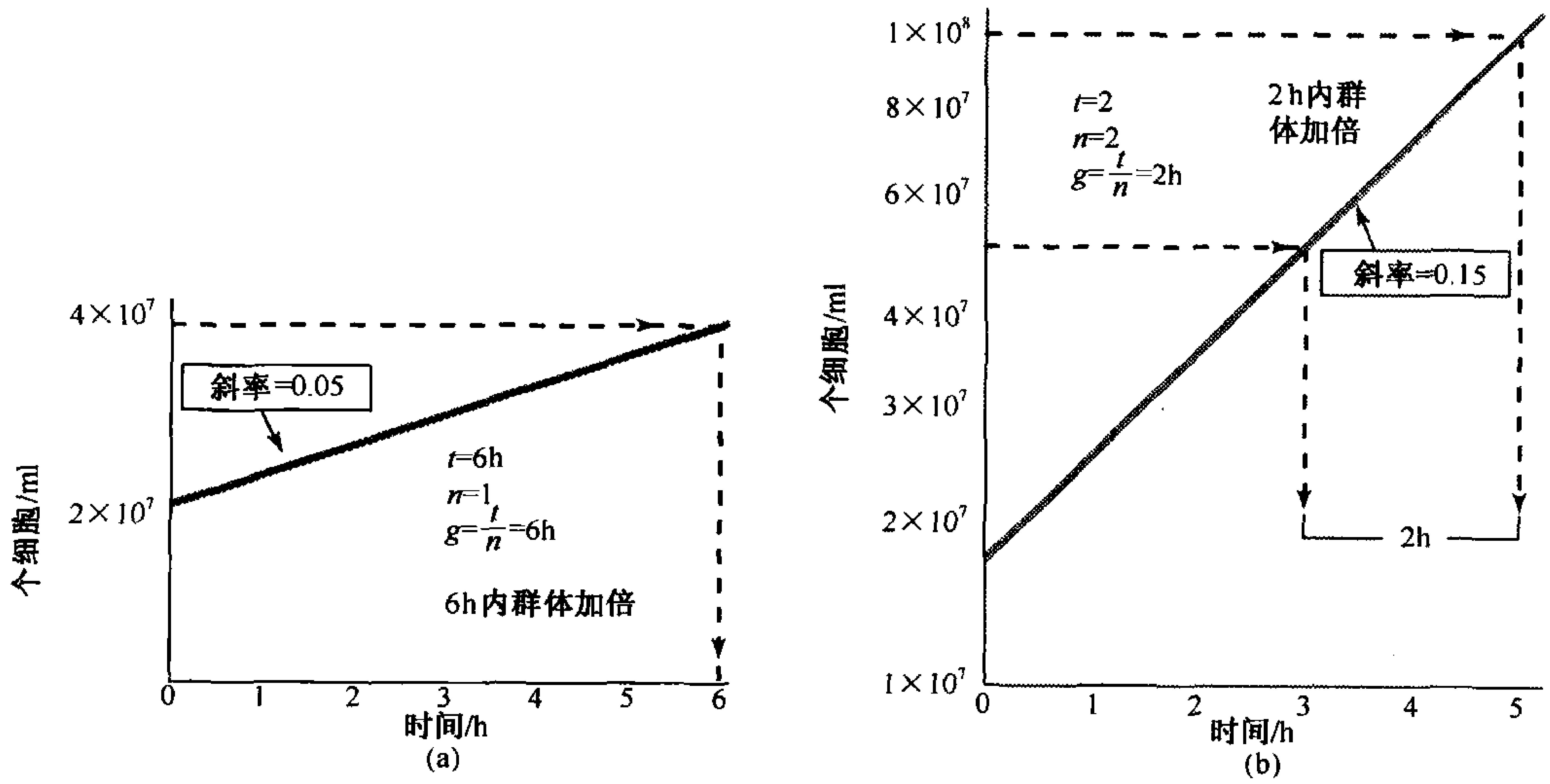


图 6.7 计算生长参数。用世代时间 g 来估算指数形式进行生长，传代时间分别为 6h (a) 和 2h (b)。数据来自描绘的半对数图。每一条线的斜率为 $0.301/g$，n 代表时间 t 内发生的代数。所有数据都以科学计数法表示，即 10 000 000 表示为 1×10^7；60 000 000 表示为 6×10^7 等。

生长前几个小时内是不会造成损害的，但在对数生长的后期相同时间就会造成巨大损害。

概念检查

微生物群体表现出一种典型的对数生长方式，这可以通过将细胞数目对时间所作半对数图看出。

- 为何对数生长在短时间内会导致细胞数目的大量增加?
- 何谓半对数作图?

6.5 对数生长的数学

细菌培养物中细胞数目的指数增长是简单的二次方几何级数递增（图 6.6a），即当 1 个细胞增倍时（变成 2 个细胞），我们可以用 $2^0 \rightarrow 2^1$表示，当 2 个细胞变成 4 个细胞，我们用 $2^1 \rightarrow 2^2$表示等（图 6.6a）。由于这个几何级数是 2，在培养起始细胞数目与经过一段时间对数生长后细胞数目之间有这样一种关系：$N=N_0{}^{2^n}$。式中，N 是最终细胞数目，N_0是起始细胞数目，而 n 为传代次数，即在对数生长期出现的次数。群体细胞生长世代时间 g：$g=t/n$，t 是对数生长所用的小时或分钟。因此，如果知道了对数生长期的起始和最终细胞数，就可以计算出 n，知道了 t 和 n 就可以计算出世代时间 g。

N 和 N_0之间的关系

为了表示等式 $N=N_0 2^n$中 n，有必要进行下面转换：

$N=N_0 2^n$

$\log N=\log N_0+n\log 2$

$\log N-\log N_0=n\log 2$

$N=(\log N-\log N_0)/\log 2=(\log N-\log N_0)/0.301=3.3(\log N-\log N_0)$

现在用此公式就可以用很容易地用测量到的数目 N 和 N_0来计算世代时间。现在举例说明如何计算世代时间，我们使用图 6.7 中的实际数据。其中 $N=10^8$，$N_0=5\times10^7$，$t=2$；$n=3.3[\log(10^8)-\log(5\times10^7)]=3.3(8-7.69)=3.3(0.301)=1$。从图中直接得出世代时间为 2h，如果对数生长的时间为 2h，则细胞的数目将会增加到 2×10^8。

相关的生长参数

世代时间 g 也可以从对数生长的半对数图中直线斜率计算出来。斜率$=0.301n/t$ $(\log 2n/t)$，前面的例子中为 $0.301\times(1)/2$，或者是 0.15。由于 g 等于 $0.301n/t$，因此也可以得到 g 为 2。$0.301n/t$ 叫做特定生长速率，简称为 k。

另外的一个生长参数是世代时间的倒数，叫做分裂速率，简称为 v。分裂速率等于 $1/g$，单位为时间的倒数 h^{-1}。G 用来衡量细胞数目加倍所需的时间，而 v 是用来衡量对数生长期内单位时间发生的代数。细胞数目与时间作图的斜率为 $v/3.3$。

知道了 n 和 t 之后，我们就可以计算在不同的培养条件下不同微生物生长的 g、k 和 v。这在优化某种微生物的生长条件时和检验一些因素对细菌培养物的影响时非常

有用。

概念检查

知道了对数生长期开始和结束时的细胞数目就可以直接计算出细胞群体生长的世代时间和生长速率。几个关键的生长参数为 n、g、v、k 和 t。

◆ 区分世代时间和生长速率。

◆ 如果在 8h 的对数生长期内细胞数目从 5×10^6个/ml 增加到 5×10^8个/ml，计算 n、g、v、k。

6.6 生长周期

图 6.6 所提供的数据只反映了微生物群体生长周期的一部分，这一部分叫对数生长。在一个封闭的容器（如试管或者三角瓶）中进行的培养叫做分批培养（batch culture），这种情况无法明确定义对数生长。但是可以获得一个典型的生长曲线。图 6.8 就表示了一个典型的群体细胞生长曲线。这个生长曲线可以分为几个不同时期，即停滞期（lag phase）、对数期（exponential phase）、稳定期（stationary phase）和衰亡期（dead phase）。

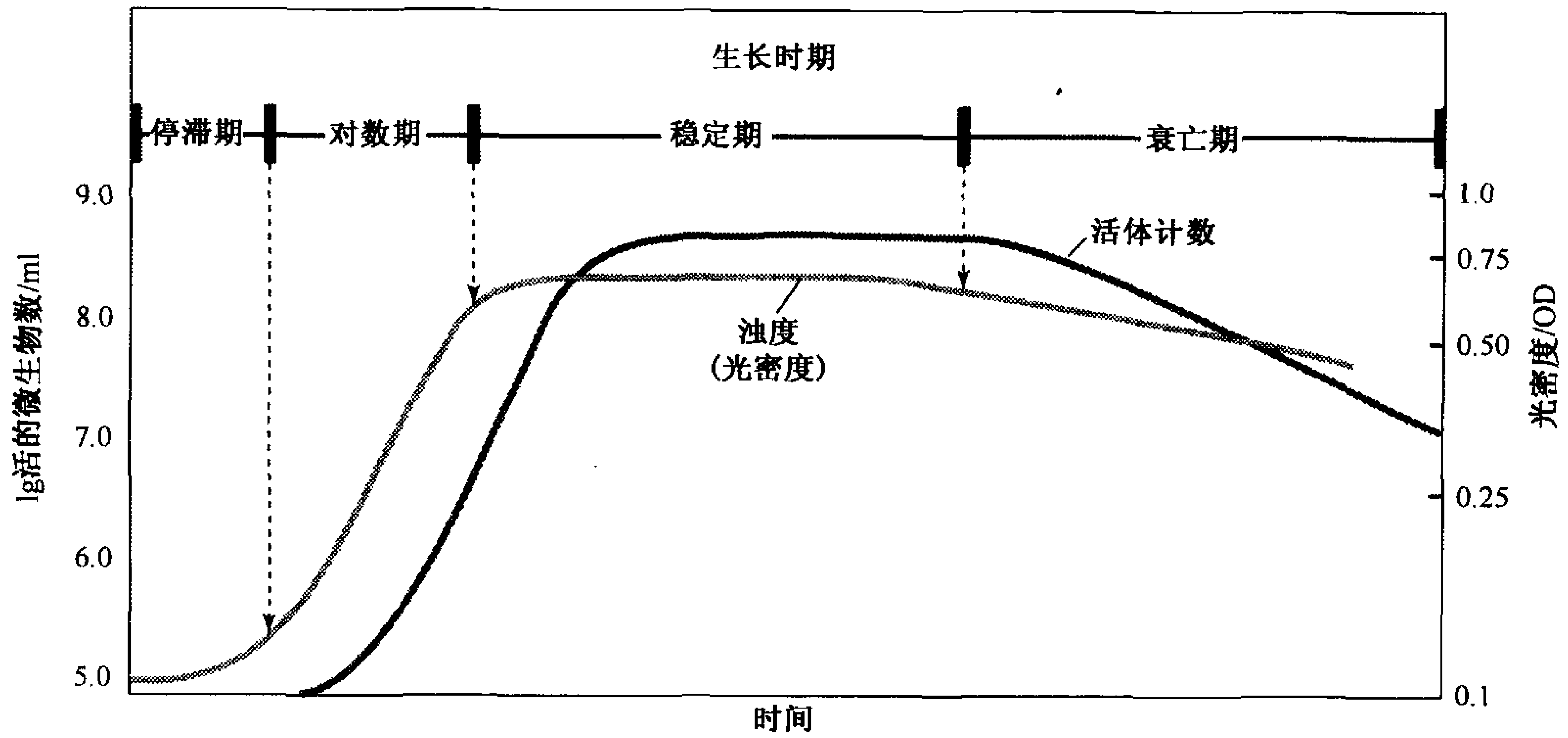


图 6.8 典型的细菌群体生长曲线。采用活菌计数技术对培养物中能进行复制的细胞进行计数。详细方法见 6.5 节和 6.6 节。混浊度光密度是衡量液体培养物中光散射程度的一个指标。

停滞期

把一些微生物接入新鲜培养基时，通常不会立即生长，需要经历一段称为停滞期的时间，这个停滞期一般很短，或者根据培养时间和生长条件有时会被延长。如果把对数生长期培养物接入相同的培养基，并在相同生长条件下培养，则不会出现停滞期，并且立即开始对数生长。但如果种子液是取自衰老的培养液（稳定期），并接入相同的培养

基，即使种子液中细胞都是活的，都能复制，通常也会出现停滞现象。这是因为此时细胞一般都耗尽了许多必需的组成物，必须需要时间重新合成它们。当种子液含有被热处理、射线或有毒化学物质损伤的细胞（没有被杀死）时，也会出现停滞现象，因为细胞需要时间去修复这些损伤。

当群体细胞从营养丰富的培养基转移到一个营养不良的培养基时，也会观察到停滞现象。这是因为在特定培养基中，细胞要生长必须具备一套完整的酶系去合成培养基中不存在而对细胞来说又必需的代谢物。当微生物转移到新鲜培养基时，需要时间去合成新酶。

对数期

前面已经讨论了对数期（exponential phase），就如我们讲过的，它是 1 个细胞分裂生成 2 个细胞，而 2 个细胞中每一个又继续进行分裂再生成 2 个细胞……更多细胞等一系列过程，这一过程可长可短，要取决于原料的可利用性和其他因素。对数生长期的细胞通常处于最健康的时期。因此，对数生长中期的细胞对于研究酶和细胞的其他组分是很合适的。

许多单细胞微生物都是对数生长，但对数生长的速度变化却很大。对数生长的速度受环境条件（温度、培养基组成）及微生物自身遗传特性的影响。一般原核微生物比真核微生物生长快，小的真核微生物比大的真核微生物生长快。在第 4 章的表面积/体积比率中已经涉及这些（见 4.4 节），已经看到小细胞在获得营养和废物交换上具有更高的能力，这种代谢能力会显著影响它们的生长速率。

稳定期

分批培养（batch culture）中（如在试管或者三角瓶中）（见 5.5 节），对数生长不可能无限制地存在。可以计算一下，一个单细胞细菌世代时间为 20min，如果连续对数生长 48h，生成的群体细胞重量约是地球重量的 4000 倍。这种现象给人的印象格外深刻，因为一个单细胞重量约为 1×10^{-12}g（表 3.2）。

很明显，这种情况不可能产生，在此之前一定有一些物质限制了群体细胞生长。一般情况下有 1 或 2 种因素限制细菌生长。①培养基中必需的营养物耗尽；②微生物产生的一些废物积累在培养基中，达到了一定抑制水平，所以对数生长停止，细胞群体达到稳定期（stationary phase）。

稳定期细胞数目没有净增加或净减少。虽然没有出现生长，但许多细胞功能（包括能量代谢和某些生化合成过程）都仍在继续。在某些微生物中，细胞仍会出现缓慢生长，但是没有出现细胞数目的净增长。某些细胞在群体中生长，而另一些则死亡，这两个过程相对平衡，使细胞数目不会出现净增长和净减少，这是一种隐蔽生长（cryptic growth）现象。

衰亡期

如果到达稳定期后仍继续培养，这些细胞或许仍能维持生命和继续进行代谢，但它们也可能死亡。如果有后者情况出现，就认为细胞处于衰亡期（dead phase）。在一些情况下，死亡伴随着溶菌（lysis）现象一同出现。需要注意的是图 6.8 中所示的生长周期中衰

亡期也是对数函数，但在许多情况下，细胞的死亡速度远低于细胞对数生长速度。

在总结这小节之前，应强调的是图 6.8 中所示的细菌生长曲线的各个时期反映的是群体细胞的生长过程而不是单个细胞生长事件。所谓停滞期（lag phase）、对数生长期（exponential phase）、稳定期（stationary phase）和衰亡期（dead phase）不适用于单个细胞，只适用于细胞群体（cell population）。

概念检查

接种到新鲜培养基的时候，微生物会表现出一种特征性生长方式。通常有一个生长停滞期，然后以一种指数方式开始生长。营养物质耗尽或者有毒产物积累起来的时候，细胞的生长停滞，细菌群体进入了停滞期。如果继续培养细胞则会死亡。

◆ 细胞生长曲线的哪个时期会进行有规律的细胞分裂过程？
◆ 何时不会发生停滞生长期？
◆ 为何细胞会进入停滞期？

Ⅲ 测量微生物生长

可以从细胞数目的变化或者细胞总重量的变化测量群体生长。这里有几种测量细胞数目和估测细胞粗重的方法，适用于不同微生物或不同研究。

6.7 微生物生长的直接测量：总数和活菌计数

总细胞计数和活细胞计数是两种应用性很广泛的计数单细胞个体的方法。每个方法都有自身的优点和缺点，在计算单个细菌培养物时会产生不同的结果。

总细胞计数

可以在显微镜下直接计算样品的细胞数目，如显微镜直接计数法（direct microscopic count）。有两种用显微镜计算微生物数目的方法，一种是样品干燥固定在载片上，另一种是液体样品。对液体样品来说，需要使用特殊的计数小室。计数小室就是在玻璃载片的表面刻上了一个已知面积的小方格（图 6.9）。在方格上每一小面积都有已知的体积，体积极小，但却是精确测量过的。方格上单位面积中的细胞数可以在显微镜下算出，这样可以测量出每一小室中的细胞数目。于是很容易地把这个数值转化成每毫升细胞悬浮液中的细胞数目。根据小室样品体积，把此数值乘以一个转换系数即可（图 6.9）。

显微镜直接计数法是迅速估测微生物细胞数目的一种方法。但它具有一些局限性。①不能把死细胞和活细胞区分开；②一些小的细胞在显微镜下很难看到，而且有些细胞也可能被丢失掉；③很难获得精确的计算；④当样品不被染色时，需要相差显微镜；⑤这个方法对低浓度悬浮液通常不适用对细菌而言，如果细胞悬浮液细胞密度少于10^6个/ml，则在显微镜视野中几乎看不到任何细菌；⑥计数之前必须对运动的细胞进行固定。

微生物生态学中经常要采用普通或者特殊染色的方法对自然样品的细菌数目进行测

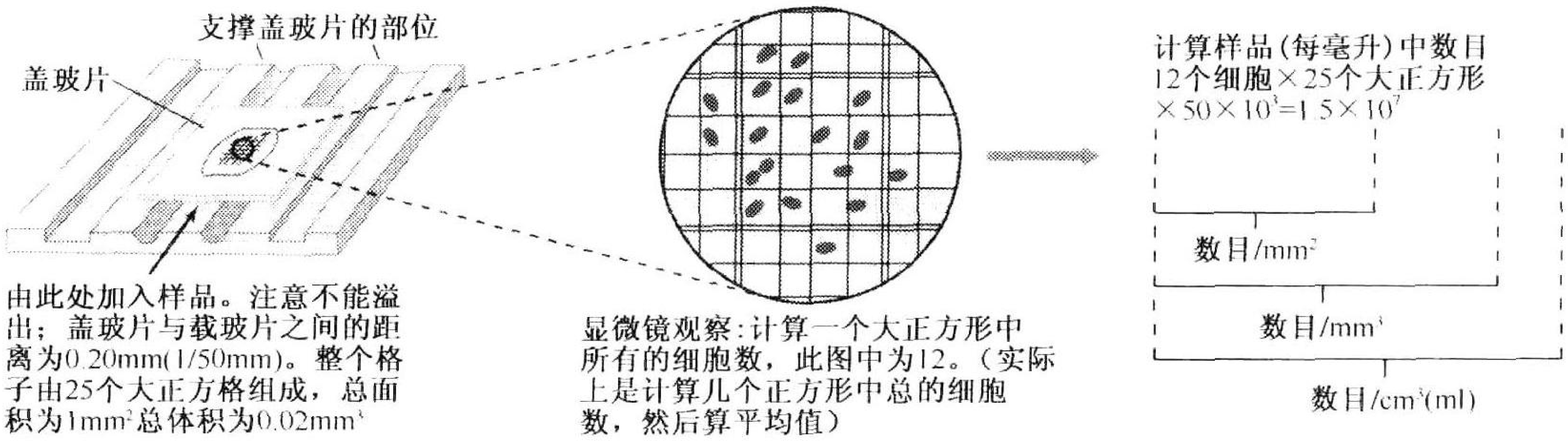


图 6.9 使用 Petroff-Hausser 计数室用显微镜计数的步骤。通常使用相差显微镜计数以避免染色。

定。DNA 特异的染色剂 DAPI 能对样品的所有细胞进行染色（图 18.6）。而荧光染色只能通过将微生物个体与核酸探针结合起来对某种或者某些微生物进行特异性染色（图 18.11）。如果细胞的浓度非常低（如开放的海洋环境），则应当通过过滤的方法进行浓缩，染色后进行计数。

活菌计数

在刚刚描述的计数方法中，活细胞和死细胞都计算进去了。在许多情况下，我们只对活细胞感兴趣，为此发展了活菌计数（viable count）的方法。活细胞定义为可分裂和生成后代的细胞，并且一般进行的活菌计数就是要确定样品中能够在适宜的琼脂营养培养基上生成菌落的细胞数。因此活菌计数通常叫做平板计数（plate count）或者菌落计数（colony count）。在这种类型计数过程中是假定一个活细胞只产生一个菌落。也有一些染色过程可以表示出细胞的活性（图 18.7），但菌落计数是活菌计数中最常用的方法。

有两种平板计数方法：涂布平板法（spread plate method）和倾注平板法（pour plate method）（图 6.10）。对涂布平板法而言，就是把浓度适当的不大于 0.1ml 的稀释菌液，用无菌涂棒涂在琼脂平板表面。然后培养，直到出现菌落，并计算菌落数。保持平板的表面干燥是非常重要的，这样便于液体渗入到培养基中。一般滴加的菌液不会多于 0.1ml，因为多余的菌液不能渗入到琼脂培养基中导致生成的菌落相互重叠难以计数。

在倾注平板法中（图 6.10），一般用移液管吸取 0.1～1.0ml 培养液加入到无菌平皿中，然后加入熔化的琼脂培养基，并在桌面上轻轻旋转使之混匀，这样可以使培养液与熔化的培养基混匀。此法中使用的培养液可以大于涂布平板法中所使用的培养液量。但是在倾注平板法中，熔化的培养基温度应在 45℃左右，使微生物在短时间内能够忍受，不至于被炽热的培养基烫死。这种方法中菌落不只在培养基的表面形成，它们会在整个培养基中形成。因此，必须对平板进行仔细计数以确保所有的菌落都计算在内（图 6.10）。

涂平板之前稀释细胞悬浮液

对涂布平板法和倾注平板法而言，生长在平板上的微生物菌落都不能太多，因为在

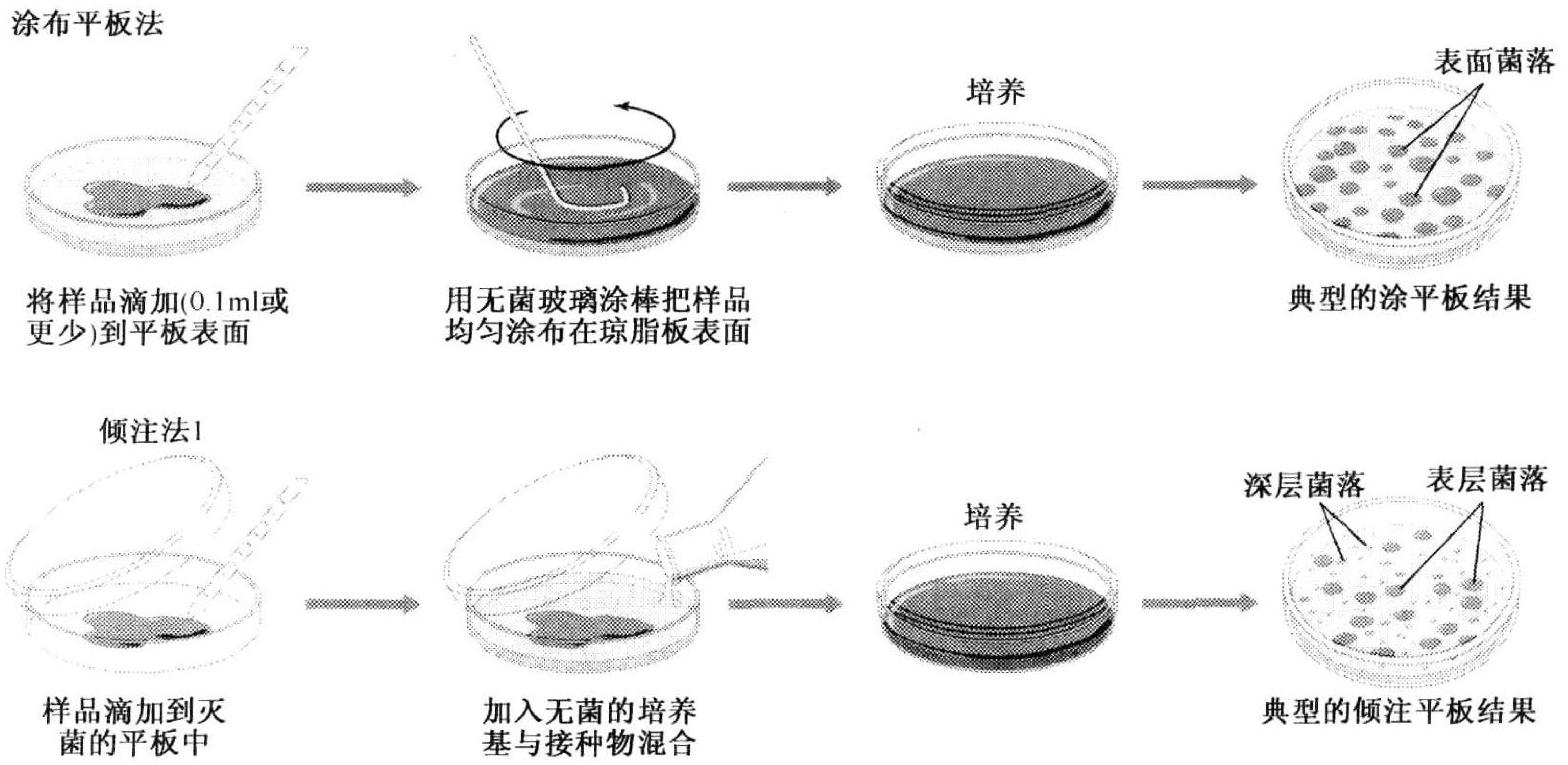


图 6.10 运用活菌计数（平板计数）的两种方法。在每一种情况下，一般样品在铺平板前要经过稀释。注意在倾注法中菌落既可以在培养基内部也可以在培养基表面形成。

密集的平板上，一些细胞可能不生成菌落，一些菌落会相互融合，导致错误的测定。平板上菌落也不能太少，否则计算的统计显著性会偏低。一般按实际情况，在平板上计算到的菌落数为 30～300 是最有效的统计计算。通常会对培养某种微生物的条件（培养基、温度和时间）加以确定已得到最大的细菌总数，并且在整个实验过程中都采用相同的条件。

为了获取适当的菌落数目，被计数的样品一般都需要经过稀释。既然事先都不清楚培养液中大约有多少活菌数，所以一般都需要进行系列稀释。一般都采用 10 倍稀释法稀释样品（图 6.11），可以取 0.5ml 样品加到 4.5ml 稀释液中，或取 1ml 样品加到 9ml 稀释液中。如果需要 100 倍稀释，则可以取 0.05ml 样品加到 4.95ml 稀释液中，或 0.1ml 样品加到 9.9ml 稀释液中。也可以这么认为，一个 100 倍稀释可以用两个连续 10 倍稀释来完成。在许多情况下，需要用这种无菌稀释法使培养物达到最后理想的稀释度。因此，如果需要 10^{-6}稀释度，可以采用 3 次连续 100 倍稀释得到，也可以采用 6 次连续 10 倍稀释获得（图 6.11）。

平板计数法误差的原因

在活菌计数法中得到的菌落数目不仅取决于接种量的大小，也取决于培养基的适用性和保温条件，还取决于培养时间的长短。如果使用混合样品，沉积在平板中的细胞不会全部以相同的速度生成菌落。如果培养的时间较短，获取的菌落数不会达到最大。此外，菌落大小也经常变化很大。如果生成了一些微小的菌落，在计数过程中可能被漏掉。如果使用的是纯培养样品，菌落的形成就会更加同步。

活菌计数可能由于一些原因造成更大的误差，包括滴加样品的不一致性、样品的不均一性、混合的不充分和其他一些因素。如果需要得到准确的计数，在准备和滴加样品时要特别小心，且对关键稀释度使用重复平板计数。需要注意的是两个或多个细胞连在

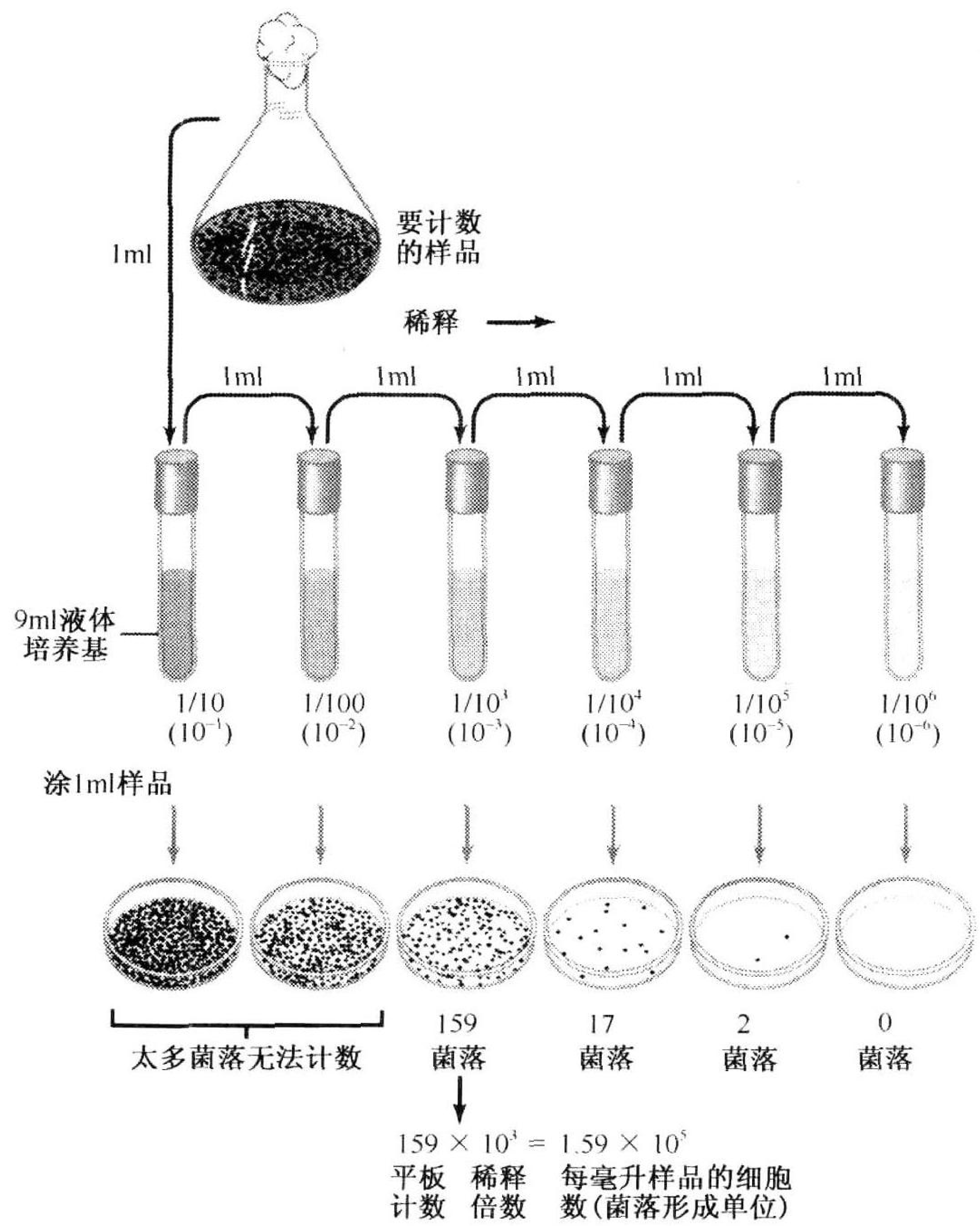


图 6.11 采用梯度稀释和平板法对样品进行活菌计数的过程。用来制作无菌悬浮液的溶剂可以是水，有时也采用缓冲液或培养基以得到更多菌数。稀释倍数是稀释的倒数。要进行平板涂布时还需要对溶液进行进一步稀释才能将 0.1ml 样品涂开。

一起只能生成一个菌落，这样通过活菌计数得到的细菌数目就可能会低。为了更清楚地说明这个结果，活菌计数经常以获得的菌落生成单位（colony forming unit，cfu）数来表示而不是以活细胞数来表示（一个菌落生成单位含有一个或多个细胞）。

尽管活菌计数有很多困难，但此方法可以为活细胞数提供最好的信息，因此被广泛使用。在食品、奶制品、医疗及水生微生物中，习惯上都使用活菌计数。此方法具有高度灵敏性的特点，含有很少细胞的样品也可以被计数，因此该方法可以灵敏地检测出被感染的产品和原料中的微生物。此外，在活菌计数法中，高度鉴别培养基和培养条件（见 5.2 节和 24.2 节）的使用便于计算微生物群体中特殊类型的细胞。例如，在食品工业中进行活菌计数的时候，在选择性培养基上进行的活菌计数既可以定量评估也可以定性评估食品中的微生物。

大平板计数异常

尽管平板计数法很灵敏，但是在对自然样品（如土壤和水）进行总细胞评估的时候结果不是非常可靠。实际上，对自然样品进行的显微计数得到的数目要比任何平板上长

出的真实微生物数目要多（见 18.3 节和 18.4 节）。一些微生物学家将这种现象叫做大平板计数异常。

为什么平板计数显示的细胞数目要比直接用显微镜进行观察得到的数目要少呢？一个因素是，显微镜直接计数法将死细胞计算在内，而活菌计数法则没有。另外，即使在很少量的样品中，不同微生物对能源和条件的要求不同（第 5、6、17～19 章）。因此，一种培养基和一些培养条件只能适应于某一类微生物生长。如果在一个浓度为 10^9/g 的样品中，这一类微生物占据了 10^6/g，平板计数法最多只能显示其中的 0.1%，这大大低估了样品中的活细胞数目。

因此结论很清楚，采用特定的选择性培养基所进行的特定目标的平板计数，如对污水或者食品进行的微生物分析会得出相当可靠的结果（见 28.1、29.1 和 29.4 节），相反，用单一培养基和一些培养条件对相同的样品进行全细胞计数可能会大大低估计数结果一到几个数量级。

概念检查

细胞生长的测定是通过测量细胞数目的变化而实现的。显微计数计算的为细胞群体中所有的细胞，而活细胞计数只计算了所有活细胞数目。

- 为什么活菌计数法比显微计数法灵敏？
- 将平板计数法与细胞数目联系起来的最主要假设是什么？
- 描述一下如何将细胞悬浮液稀释到 10^{-7}？
- 什么是大平板计数异常？

6.8 微生物生长的间接测量：混浊度

一个快捷和非常有用的测量细胞数的方法是浊度测量（turbidity measurement）。细胞悬浮液用肉眼观察是呈现混浊状的，这是因为光线通过悬浮液时细胞散射光线。存在的细胞数越多，分散的光线就越多，因此悬浮液浊度就越大。

可以用光度计（photometer）或分光光度计（spectrophotometer）测量混浊度，分光光度计和光度计射出的光线通过细胞悬浮液时，就可以检测出没有被细胞散射的光线（图 6.12）。这两种仪器的主要区别是光度计使用简单的滤片（常是红色、绿色、蓝色）产生相对较宽波段的入射光，而分光光度计使用一个棱镜或衍射光栅，产生一束窄波段的入射光照射到样品上（图 6.12a）。测量细菌浊度常用的波长包括 540nm（绿色）、600nm（橙色）和 660nm（红色）。但两种仪器都只是测量未被散射的光线，细胞数目增加的时候散射光降低。而且对光度计而言采用光度计单位（例如，Klett 单位，用于 Klett-Summerson 光度计）（图 6.12b），对分光光度计而言采用光密度单位（OD）。

制作标准曲线

对于单细胞微生物，光度计单位或 OD 值都是与细胞总量和细胞数目成正比的（在一定范围内）。因此，浊度读数可以替代直接的计数方法。采用浊度估测细胞数目和粗

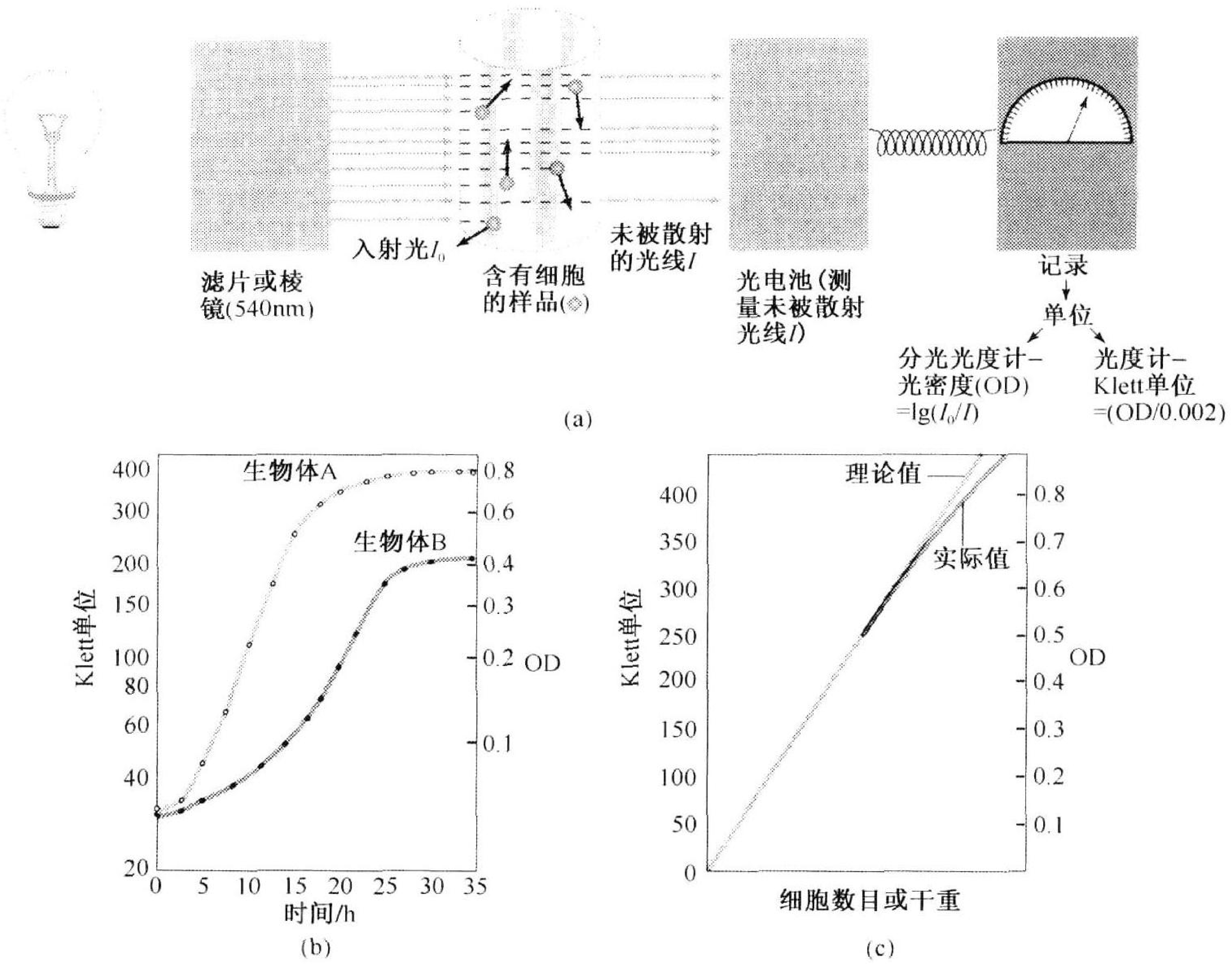


图 6.12　微生物生长的混浊度测量法。（a）可以用分光光度计和光度计测量混浊度。光电池测量未被悬浮液中细胞散射的光线，且记录光密度值或光度计单位。（b）表示两个生物体以不同的生长速度生长的两条典型曲线，所采用的数据是 Klett 单位。例如，计算两种培养物世代时间（g）时使用公式：$n=3.3\ (\log N-\log N_0)$，此处 N 和 N_0 是在时间间隔（t）内得到的两个不同的 Klett 值或 OD 值。其中哪个生物生长的更快？（c）细胞数目或干重与读出的浊度值之间的关系。需注意的是在高浊度情况下，这种一对一的对应关系会被破坏。

重之前，对每一种所研究的微生物都必须事先制备一条标准曲线（standard curve），这条标准曲线可以把直接测量到的细胞数目（显微镜或活菌计数）或粗重（干重）与间接从浊度测定到的量相联系起来（图 6.12c）。这样一条曲线既包含细胞数目的数据，又含有细胞干重的数据，这样的曲线可用于直接从简单的浊度指示数确定 2 个系数（图 6.12c）。

在含有高细胞浓度的悬浮液中，光线被一个细胞散射出去后，又被另一个细胞重新散射回来，这对光电池而言，看起来好似光线从没有被散射过，当出现这种情况时，细胞数目与浊度之间一对一的对应就失去了线性关系（图 6.12c）。因此，在限定的范围内，浊度测量是相当准确的，并且具备快速测量、操作方便等优点。

除此之外，一般浊度测量不会损伤或在较大程度上影响样品。为此，在观察微生物培养物的生长速度时，广泛使用浊度测量法，同一种样品也可以重复地进行测定。在半对数图上，测量到的数据与时间的关系曲线（图 6.12b），常用来估测正在进行生长的培养物的世代时间。

概念检查

浊度测定是间接的，但它是一种快捷和很有用的测定微生物生长的方法。然而，要把细胞计数和浊度联系起来还要建立一个标准曲线。

◆ 列出采用浊度法测定细胞生长的两个优点。

◆ 描述一下你如何采用浊度测定方法来掌握给定OD值的培养物中的菌落数？

6.9 连续培养：恒化器

我们所讨论的群体生长到目前为止还仅局限于分批培养（batch culture）。分批培养就是在固定体积培养基中微生物的生长会连续不断地被正在生长的微生物体代谢活动所改变，直到培养基不再适合它的生长，因此这是一个封闭的系统（closed system）。在分批培养的对数生长前期，培养条件或许可以维持相对稳定，但在后期，当细胞数目变得非常大的时候，培养基的化学组成一般会发生巨大变化。

对许多研究来说，都希望能长时间地使培养物处于一种稳定的环境中。例如，人们在研究一个生理过程（如特定酶的合成过程）时，能够很容易地得到处于对数生长期的细胞，这可以通过连续培养获得。连续培养实质上就是在体积恒定的开放流动体系中，连续地注入新鲜培养基，也连续不断地移去过剩的培养物。一旦这样一种体系达到平衡，细胞数目和营养状态会维持恒定，这个体系就被认为处于稳定态。

恒化器

最普通的连续培养装置是恒化器（chemostat）（图6.13），它既可以用来控制群体细胞密度（population density），又可以用来控制培养物生长速度（growth rate）。在控制恒化器中需要两个要素，即稀释率和限制性营养物质浓度（concentration of a limiting nutrient），如碳源或氮源。

分批培养中营养物浓度可能会影响微生物的生长速率和产量（图6.14）。在营养物浓度极低的情况下，生长速率减慢，这或许是因为营养物不能足够快地被转移进入细胞内，以满足代谢需要，而在适度或较高营养物浓度水平下，生长速率不会受到影响，细胞产率却可持续增长（图6.14）。与分批培养相比，在恒化器中，可以独立地控制生长速率和生长率。前者可以通过调整稀释率而控制，后者可通过改变所提供的有限量的营养物浓度控制。

图6.15表示了改变稀释率（D）和生长限制性营养物质浓度对生长的影响。可以看出，虽然在稀释率极低和极高的两种状态下，稳定态会被破坏，但在相当广的稀释率范围内，稀释速率控制着生长速率。在高稀释率情况下，微生物的生长不够快，不能维持它与稀释率的平衡，因此培养物会“溢出”恒化器。在其他的极端情况下，如非常低的稀释率，一大部分细胞可能因为饥饿而死亡，因为限制性营养物的添加不足以维持细胞代谢的需要。

恒化器中的细胞浓度是通过限制性营养的水平来控制的，就如同在分批培养中细胞

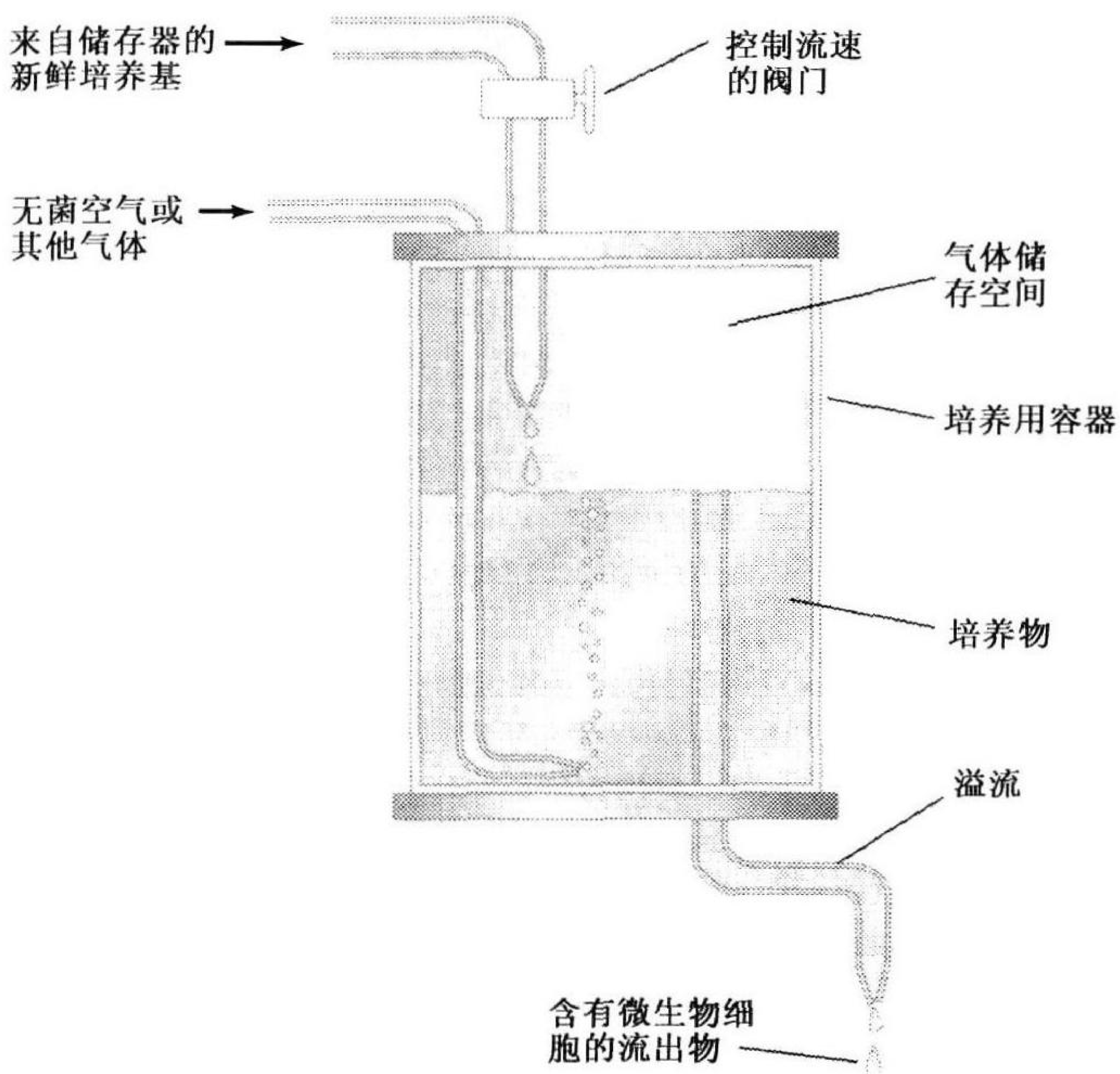


图 6.13 连续培养用的装置图（恒化器）。在这种装置中，储存器中限制性营养物质浓度控制着群体细胞的密度，而流速则控制着生长速率（图 6.15），两个参数都可以被实验者设定。

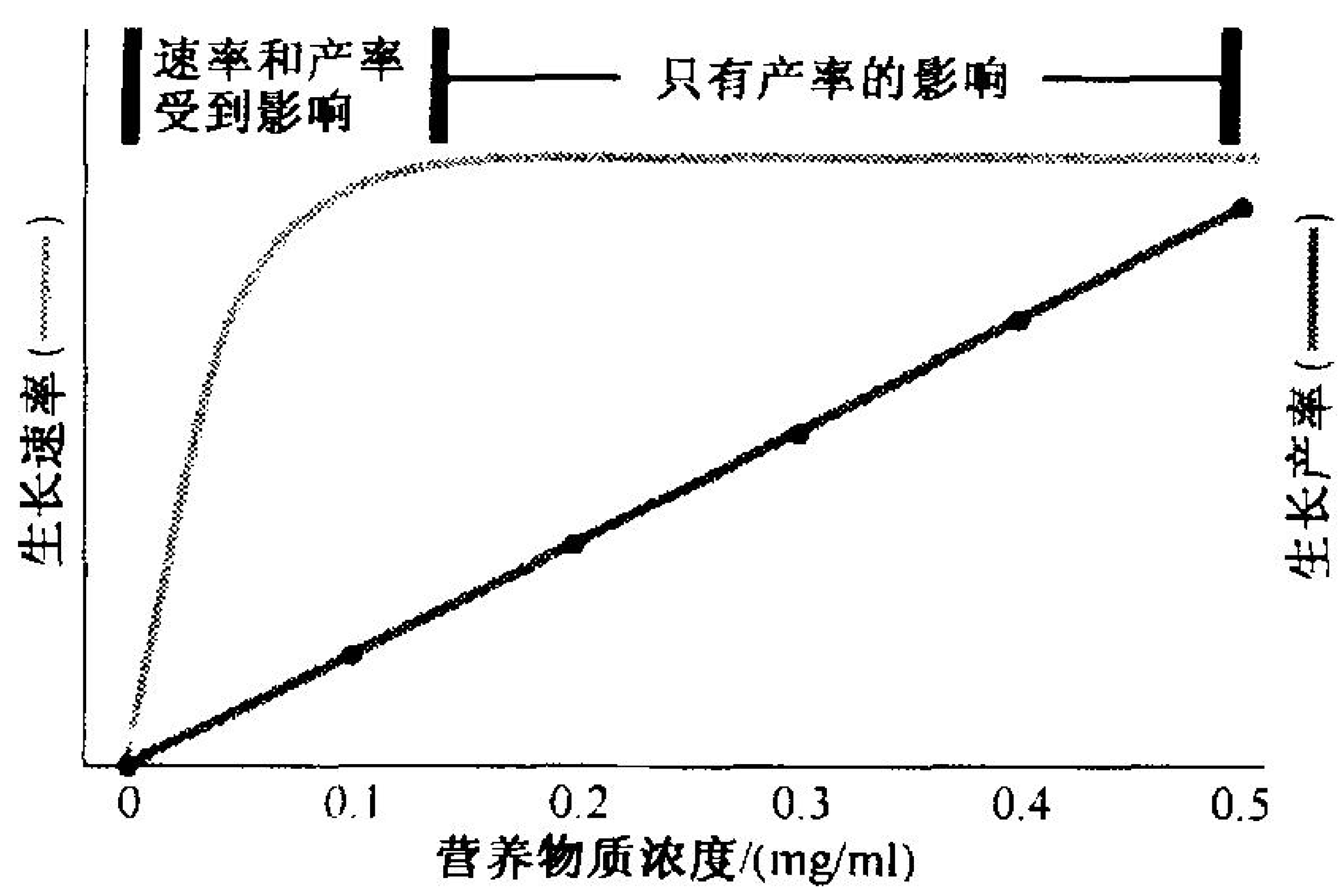


图 6.14 营养对生长的作用分批培养中（封闭体系），营养物浓度、生长速率（实线）和生长产率（虚线）之间的相互关系。在营养物浓度低的情况下，生长速率和产率都会受到影响。

的产量受到控制一样（图 6.14）。如果在新加入的培养基中这种营养物的浓度是提高的，稀释率保持相同的话，细胞的密度就会增加。因此，通过调整稀释率和营养物质的浓度，研究者可以获得缓慢生长、适度生长或者快速生长的低浓度（如 10^5 个/ml）、中浓度（10^7 个/ml）或者高浓度（10^9 个/ml）的细胞悬浮液。

恒化器的实际应用

正如前面所提到那样，恒化器使实验者能独立地控制生长速率和群体密度。如图 6.15 所示，仅仅通过改变稀释倍数就可以获得在很大范围内变化的生长速率。与此相

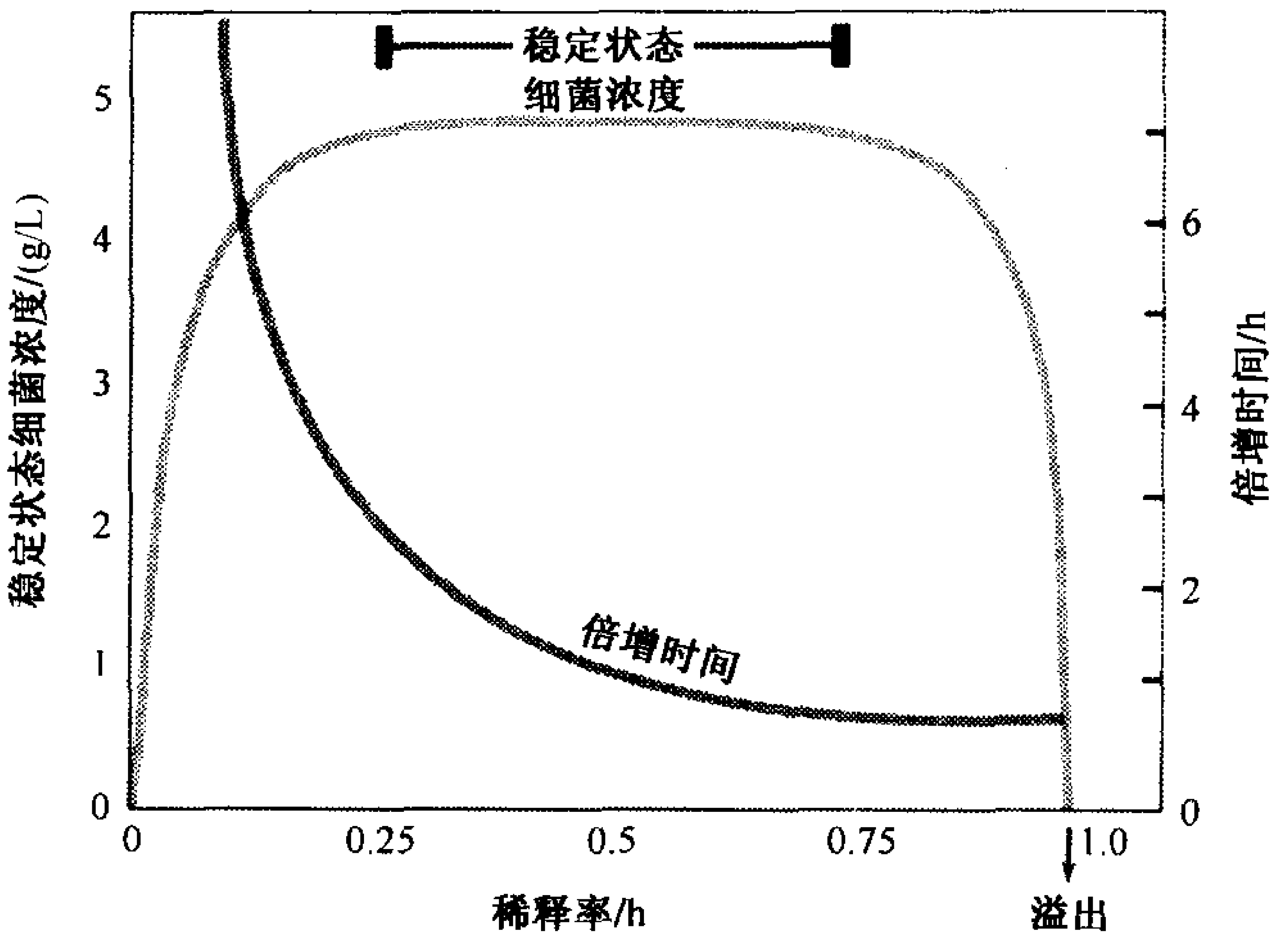


图 6.15 恒化器处于稳定态时各参数之间相互关系。稀释速率是由流速和培养容器的体积所决定的。因此，如果容器的体积为 1000ml，通过容器的流速为 500ml/h，则稀释速率为 0.5h^{-1}。需注意的是，在高稀释率情况下生长与稀释之间不可能建立平衡关系，群体细胞会溢出，底物浓度会升高到与储存器中培养基相同的浓度（因为没有细菌利用这些流入底物）。但是在大部分稀释率范围内，群体细胞密度保持恒定，且底物浓度保持一个极低值（这就是稳定态）。需注意的是虽然群体细胞密度保持恒定，但微生物生长速率（倍增时间）会在一极宽的范围内变化。因此实验者可以在广泛变化的生长速率范围内获得群体细胞，而无需影响群体细胞的密度。

类似的是，通过改变培养基中的单一的生长限制因素就可以设定细菌的密度。在分批培养过程中，独立控制其中两个关键的生长因素是不可能的，因为分批培养是一个封闭体系，生长条件会随着时间的改变经常发生变化。

恒化器在实际应用过程中的一个优点是可以长时间（如几天或者几周）保持对数生长状态。由于对数期细胞对于生理实验是非常必需的，利用恒化器的试验者可以在任何时候获得这些状态的细胞。因此，可以精密地设计实验并在任何方便的时候进行试验。而且，如果知道细菌群体会保持一致的状态就可以进行重复实验。在某些应用方面，如对特定酶的研究，静止期的酶活性要比对数生长期的酶活性低得多，因此在恒化器中生长的培养物对于研究酶活性而言是最理想的。

在研究微生物生态学的时候也可以采用恒化器。例如，由于恒化器可以很容易地模拟自然界中经常出现的低浓度底物的状态，因此就有可能利用恒化器研究混合细菌群体，对在特定营养浓度条件下不同微生物之间的竞争作用做出回答。利用培养方法及分子生态学方法（如系统染色和基因跟踪）（第 8 章），就可以以恒化器的条件作为参数跟踪微生物群落的变化。这些实验经常会揭示一些在分批培养过程中不能明显表示出的相互作用。

恒化器也被用来富集和分离细菌（见 1.7 节、18.1 节和 18.2 节）。研究者可以在选定的营养条件和稀释倍数下从混合接种物中选择到稳定的群体，然后慢慢地提高稀释倍数直到得到单一的微生物。通过这种方式，微生物学家最近分离得到了一株世代时间为 6min 的细菌，它是目前为止生长最快的细菌。

概念检查

连续培养装置（恒化器）是将细胞群体长期保持在对数生长期的一种方式。恒化器中，稀释倍数控制生长速率。群体大小由进入容器中的生长限制营养物质决定。

◆ 恒化器中的微生物和分批培养中的微生物有何区别?

◆ 恒化器中如果稀释倍数超过了某种微生物的最大生长速率会发生什么事情?

◆ 纯培养必须在恒化器中应用吗?

Ⅳ 环境对微生物生长的影响：温度

到目前为止，我们所描述的都是在理想的实验室条件下微生物的生长。但是，微生物实际生理活动在很大程度上会受到生存环境中化学、物理条件的影响。了解环境因素的影响，有助于我们理解自然界中微生物的分布，以及有可能使我们设计一些控制微生物活性的方法。

许多环境因素需要考虑，但确切地说有 4 种主要因素对控制微生物生长起主要作用，即温度、pH、水的可利用性和氧气。一些其他因素也可能潜在的影响微生物的生长，如压力和辐射。我们将在本书的后面部分涉及这些更为特殊的环境因素，那时我们会涉及微生物生境，这些因素起的主要作用。

6.10 温度对生长的影响

温度是影响微生物生长和生存的最重要的环境因素之一。温度太高或者太低微生物都无法生长。但在不同的微生物中最高和最低温度变化很大，这反映了它们所处生境的温度范围和平均温度。

基本温度

温度以两种相反的方式影响微生物。温度升高时，细胞内的化学和酶促反应都以较快的速度进行，微生物生长也会变得越来越快。但是超过一定的温度，蛋白质、核酸及细胞组分会受到不可逆的损害。因此当温度在一定的范围内上升时，微生物的生长和代谢机能会逐渐上升达到某一顶点，此时就会出现钝化反应。超过此顶点，细胞机能就急剧下降到零。

对每种微生物而言，都存在最低温度（低于此温度微生物就不会生长）、最适温度（在此温度下微生物以最快的速度生长）、最高温度（高于此温度，微生物也不能生长）（图 6.16）。最适温度一般更接近于最高温度而不是最低温度。这三个温度经常被称为基本温度（cardinal temperature），通常基本温度也反映了每一类微生物的特征，但并不完全固定，因为它们也可能被其他环境因素，尤其是生长所用的培养基组成轻微地改变。

不同微生物最适生长温度有很大的差别，有些微生物最适温度低至 4℃，而另一些

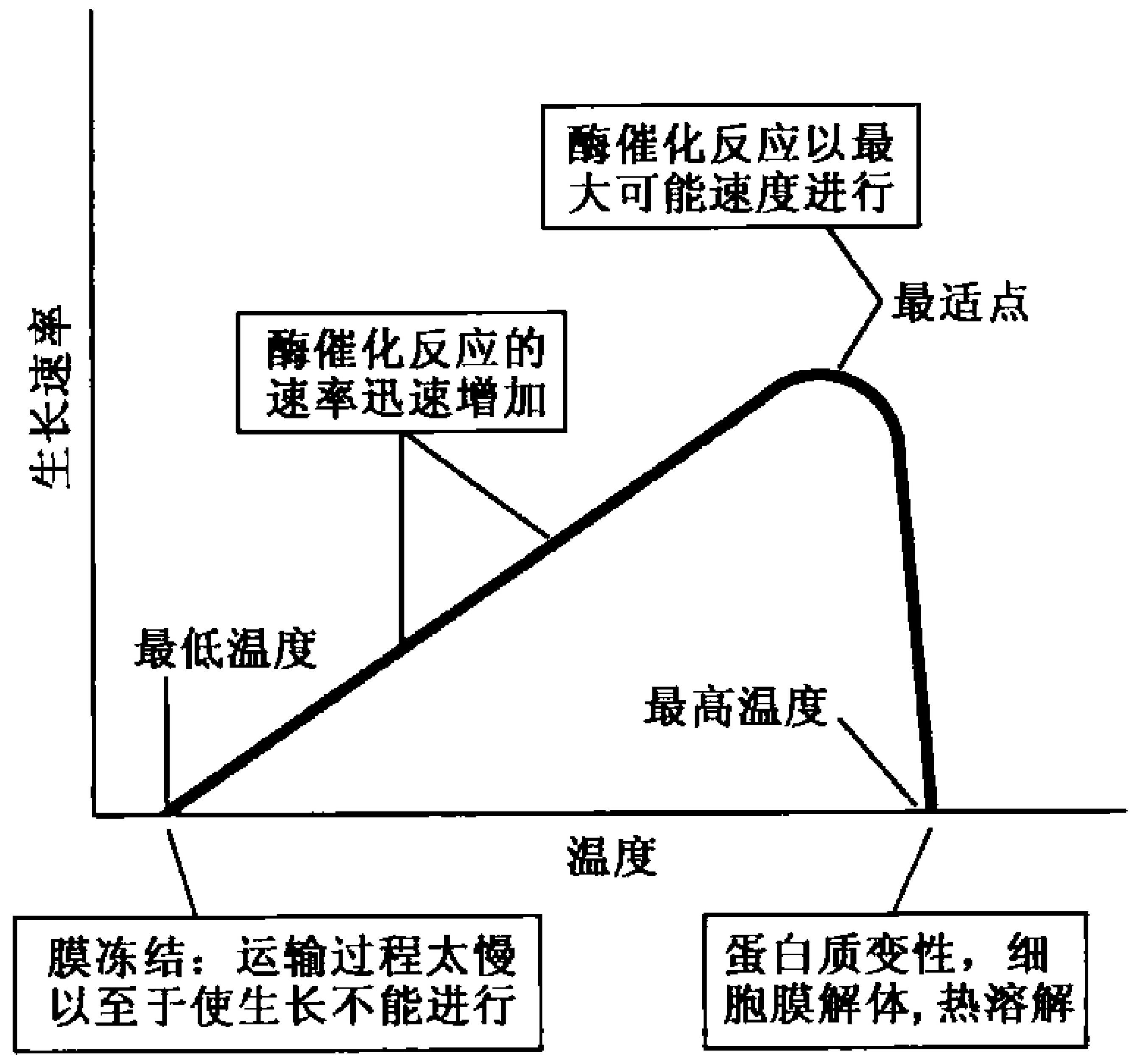


图 6.16　温度对生长速率及细胞内大分子的影响。3 种基本温度随不同生物有所变化。

微生物的最适温度却高于 100℃。微生物生长的整个温度范围甚至比这些更广泛，从冰点以下到沸点以上。但是，没有一种微生物能在这个温度范围以外生长，通常微生物生长的温度范围为 30～40℃。

某种微生物的最高（maximum）生长温度很可能反映了细胞中一种或者几种蛋白质的变性温度。但控制微生物最低生长温度的因素却不很清楚。就如前面所提到的（见 4.5 节），为了执行正常的功能，细胞质膜必须处于一种流动状态。微生物的这种最低温度很可能是"冻结"了细胞质膜，使它不能再正常运输营养物质和产生质子梯度。上面的实验可以证明这种解释，即通过调整细胞膜脂类的组成可以在一定程度上改变某种生物的最低生长温度（见 6.11 节）。从这一方面上说，在复合培养基中培养的微生物的最高和最低温度比合成培养基中要高或低。

按温度对微生物进行分类

虽然从适合极低温度下生长的微生物到适于高温下生长的微生物会呈现一个连续的微生物群体，但是，广义上根据它们的最适生长温度可分成四大类：嗜冷菌（psychrophile），具有较低最适生长温度；嗜温菌（mesophile），最适生长温度处于温度范围的中间；嗜热菌（thermophile），具有较高的最适生长温度；超嗜热菌（hyperthermophile），具有极高的最适生长温度（图 6.17）。

嗜温菌可以在温血动物体中发现，也可以在温带和热带地区的陆地及水环境中发现。嗜冷菌和嗜热菌通常分别可以在寒冷和酷热的环境中发现。超嗜热菌一般可以在极热的生长环境（如热泉、热喷泉、深海火山口）发现（见 6.12 节、13.8 节和 19.8 节）。

E. coli 是典型的嗜温菌，在仔细研究了温度对它的生长的影响之后，已经确定了它的基本温度。*E. coli* 在营养丰富的复合培养基中，最适生长温度为 39℃（见 5.2 节），最高生长温度为 48℃，最低为 8℃。因此，生长温度范围为 40℃，接近原核生物平均温度的最高值。

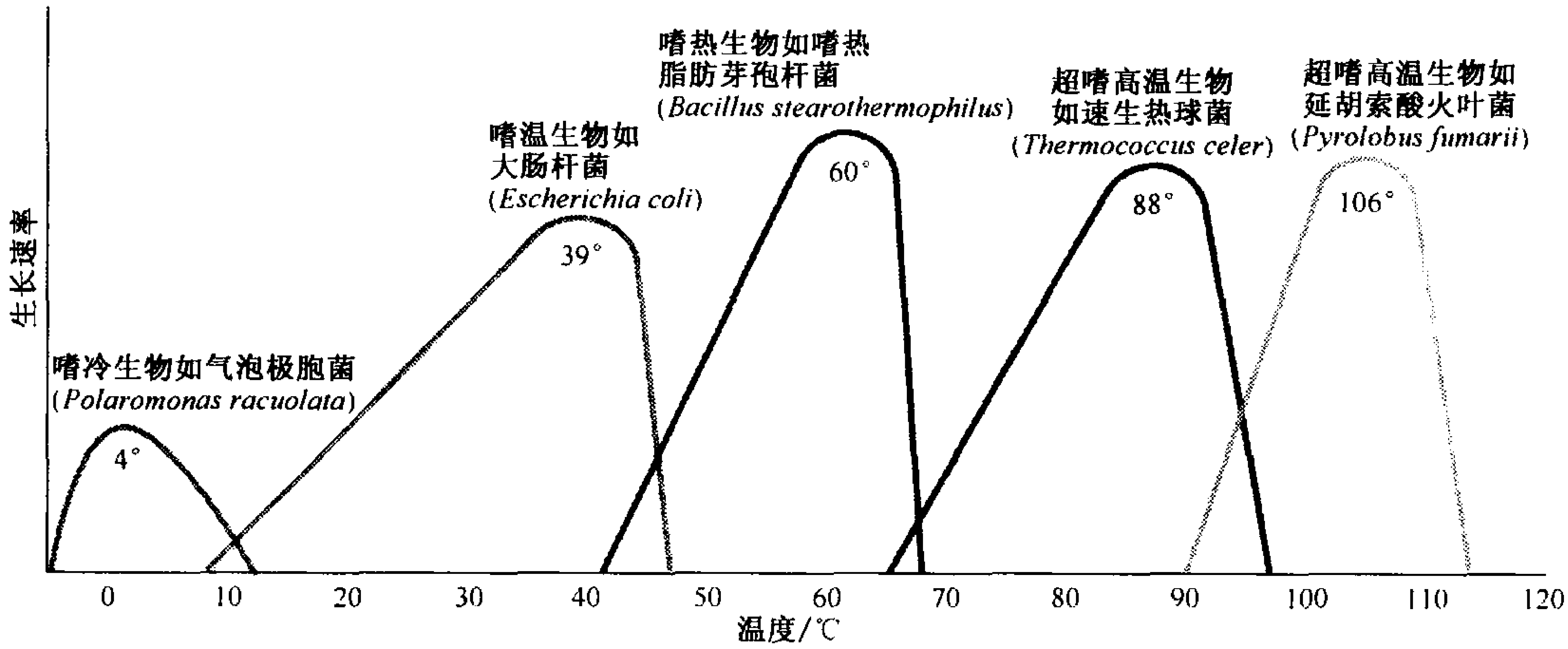


图 6.17 温度与典型的嗜冷菌、嗜温菌、嗜热菌及两种不同的超嗜热菌的生长速率之间的关系，不同生物最适生长温度已经在图上表示出来。图上所表示的超嗜热菌的最适生长温度超过 80℃。

概念检查

温度是控制微生物生长的主要环境因素。基本温度表述的是微生物生长的最低、最适合和最高温度。可以根据温度范围对微生物进行分类。

◆ 大肠杆菌的基本温度是多少？这个温度属于哪种温度？

◆ 嗜冷菌和超嗜热菌的区别在哪？

◆ 大肠杆菌在复合培养基中的生长温度比在成分已知的培养基中生长温度高，为什么？

6.11 低温下微生物的生长

人类生存和工作的地球表面温度是适中的，一般将极热或极冷的环境称为“极端”环境。如果人类居住在沸水或冰水这种极端环境中就会立即死亡。然而，自然界中有许多微生物（见 2.4 节和表 2.1），能够在这种极端环境中生存，且生物体变得适应这种环境，在这首先讨论嗜冷菌。

低温环境

大多数地球表面温度相当低，海洋覆盖了地球表面的一多半，平均温度为5℃，开放海洋深处的恒定温度为 1～3℃。北极和南极的大部分地面长期是处于冰冻状态，只有在夏天几个星期是解冻的（图 6.18）。这些寒冷环境几乎是无菌状态的，但在极低温度的液体水中仍生长着某些微生物。在许多冰冻的物质中的用显微镜才能看到的空穴中也存在着液体水，这些空穴中也会有微生物在生长。例如，在冰川中，有一个小水流组成的网络，其中生活着原核生物。

在研究寒冷环境时区别下面两种环境是非常重要的，一种是全年都处于极冷的环境

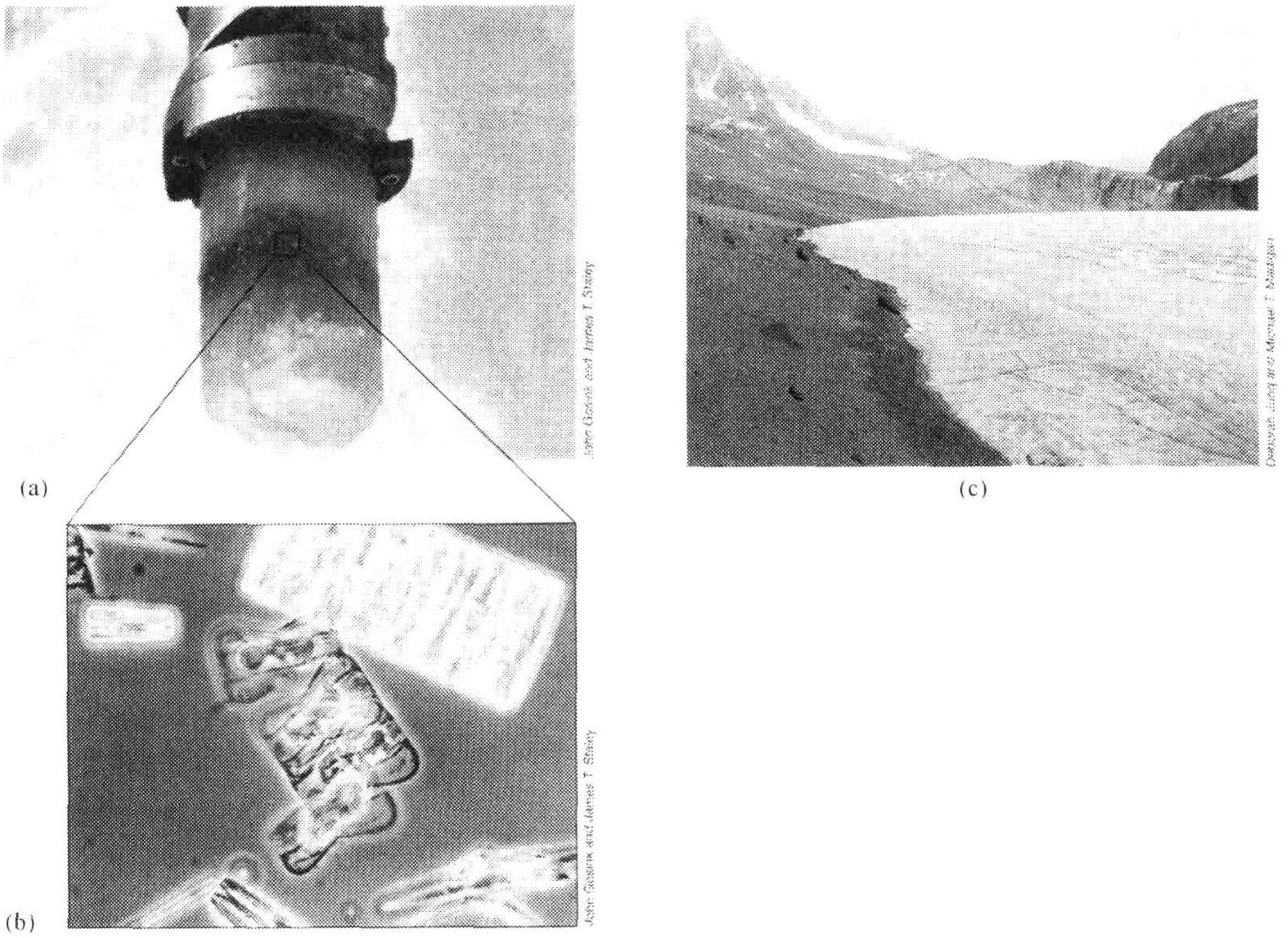


图 6.18 南极的微生物生境。(a) 来自于南极 McMurdo Sound 的一个永久冰冻的海水核心。核心大概为 8cm 宽。注意深颜色是由带有色素的微生物造成。(b) a 图核心中微生物的相差显微镜观察结果。大多数的微生物为硅藻或者蓝藻(都是真核生物,见 14.13 节)。(c) 南极 McMurdo 干谷表面图。与其他南极湖(如 Bonney 湖)一样,这个湖的深度为 40m,常年冰冻,覆盖的冰厚度为 5m。Bonney 湖的湖水温度保持在 0℃附近,包括有氧带和无氧带(见 19.5 节和图 19.9),因此既存在厌氧生物也存在好氧生物。然而,在干谷湖里没有较为高等的真核生物聚集,使得这里的微生态非常特殊。

中,另一种是只在冬天才处于极冷的环境中。后者就是大陆温带气候的特征,在夏天温度高达 40℃,冬天在 −20℃或更低。例如,温带的小湖冬天有一段时间被冰覆盖,但是水温低于零度的时间很短。嗜冷菌比那些生活在极地、高原及海洋深处的微生物更不适合这种气温高度变化的生活环境。例如,南极干谷终年保持几米厚的冰层(图 6.18c),冰层下面的水温保持在或者低于零度,对于嗜冷菌而言是理想的生活环境。

嗜冷微生物和耐冷微生物

前面提到最适生长温度较低的微生物叫嗜冷菌(psychrophile)。嗜冷菌的最适生长温度可以定为 15℃或更低,最高生长温度为 20℃以下,最低生长温度为 0℃或更低。把能在 0℃生长但最适生长温度为 20～40℃的微生物称为耐冷菌(psychrotolerant)。

在长期寒冷的环境中可以发现嗜冷菌,处于室温下很短一段时间这种嗜冷菌就会被杀死。为此,在实验室研究这种微生物时必须非常小心,确保在取样、运输到实验室、分离、用吸管移取液体及其他操作过程温度没有升高。

研究最详细的嗜冷菌是海藻，它们生活在极地冰下或冰内密集的物质中（图 6.18）。经常可以在冰雪和冰川的表面发现嗜冷藻类，它们以鲜艳的红色或绿色点缀了冰川表面（图 6.19）。最普通的雪地藻类是极地雪藻（*Chlamyclomonas nivalis*），它的孢子呈现出鲜亮的红色（图 6.19b）。在雪地生长的是这种藻类绿色的无性繁殖细胞，然后变成孢子，当积雪通过融化、腐蚀和汽化而分散时，孢子就聚集在雪地表面。在中夏到后夏，在融化后的长期积雪的地表面最容易看到雪地藻类，尤其在晴朗、干燥的地表面上非常常见。除了雪地藻类以外，还有一些嗜冷的化能有机营养的细菌，其中的大多数来自于南极（图 6.18）。其中的一些细菌，尤其是那些来自海冰的细菌，它们的最低生长温度是所有已知微生物中最低的。

耐冷微生物（psychrotolerant microorganism）比嗜冷菌分布广泛得多。从温带环境的土壤、水、肉、奶、其他乳制品及储存在冰箱中的苹果汁、蔬菜及水果中都可以分离到它们。就如前面所提及的，耐冷菌在 20～40℃能很好地生长。因为在夏季，温带环境要变暖，变暖后的环境不利于对热敏感的嗜冷菌的生存，环境变暖实际上起选择作用，它有利于耐冷菌种属的生存，却把嗜冷型微生物淘汰掉。需要强调的是，虽然耐冷菌能在 0℃生长，但大部分在此温度下并不能很好地生长，在培养基中培养这种微生物，经常等几个星期才能用肉眼观察到。细菌、真菌、藻类及原核微生物的许多种属中都存在耐冷菌。

嗜冷的分子机制

嗜冷菌产生的酶的功能，一般在寒冷条件下最佳，在非常温和的温度下，这些酶经常会变性或失活。有关的分子机制了解的还不是很清楚，但是人们已经知道与那些低温下没有活性的酶相比，低温酶含有大量的 α 螺旋而 β 折叠的数量较少（见 3.7 节和图 3.16）。因为 β 折叠容易形成更为坚固的结构，而低温酶中大量的 α 螺旋能使蛋白质在低温时形成的结构更加有韧性。

嗜冷菌的酶含有的极性氨基酸比嗜温菌和嗜热菌多，疏水性氨基酸的含量要比它们少。这也可以协助蛋白质在低温情况下维持韧性（因此具有酶活性）。并且，与那些来自较高温度最适生长的微生物蛋白比较，嗜冷菌的酶蛋白含有较低水平的弱相互作用的化学键，并且各个结构域之间的相互作用也比较弱。这些改进也有助于维持蛋白质的韧性。

与嗜温菌比，嗜冷菌另一个特征是在低温下能够进行主动运输（见 4.7 节），也就意味着嗜冷菌的原生质膜构造不同于一般的微生物，即使在低温下也不会抑制膜功能。对嗜冷菌细胞质膜成分研究表明，它们含有较高含量的不饱和脂肪酸（见 5.17 节），这些不饱和脂肪酸使膜在低温下也能保持半流动状态（主要由饱和脂肪酸组成的膜在极低温度下会变成蜡状且失去功能）。某些嗜冷细菌的膜脂也含有聚不饱和脂肪酸和含有多个双键的碳氢化合物。例如，现在已经从几种南极细菌脂类组分中鉴别出了含有 9 个双键的碳氢化合物 $C_{31:9}$，研究表明细菌冷弯菌属（*Psychroflexus*）是含有 4 个或者 5 个双键的脂肪酸。这些脂肪酸在低温下比饱和脂肪酸或者单不饱和脂肪酸的流动性要好。

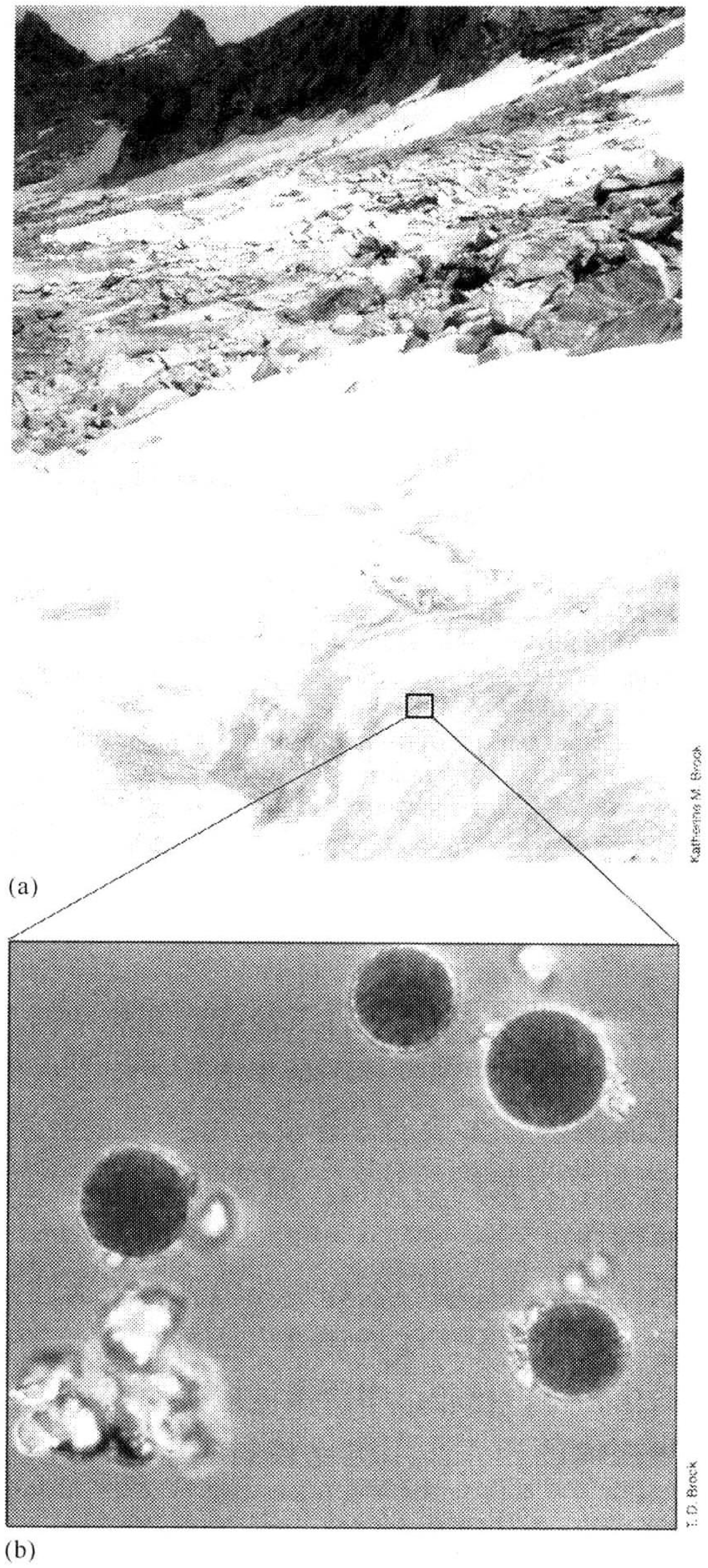


图 6.19　雪地藻类。（a）加州内华达山脉的积雪，红色是由于藻类的存在造成（真核细胞，见 14.13 节）。在高海拔地区夏天粉红积雪是很常见的。（b）雪地藻类极地雪藻红色孢子的显微照片。孢子萌发形成了能移动的绿藻细胞。和它相近的一些藻类含有不同的胡萝卜色素（见 17.3 节），因此，雪藻可以是绿色、橙色、棕色或者紫色的。

冰冻

尽管某些微生物具备在低温下生长的能力，但有最低极限，低于此极限点，细菌就不可能再复制。纯净水在 0℃结冰，而海水在－2.5℃结冰，但结冰并不是连续的过程，

在极低温度下，仍能在显微镜下观察到含有水的凹穴存在，只要有液态水就有可能有微生物生长。

虽然冰冻能抑制微生物生长，但并不总是使微生物死亡。除此之外，细胞悬浮在介质中，这些介质也在很大程度上影响了它对冰冻的敏感性。当在细胞悬浮液的培养基中加入约 10%（终浓度）与水混溶的液体，如甘油和二甲基亚砜（DMSO）后，这些物质渗入细胞，可减缓强烈的脱水作用，抑制冰晶生成，从而保护细胞。实际上，加入的这些额外因子叫细胞保护剂，是在极低温度下（一般－70～－196℃）保存微生物的一个常用方法。

概念检查

最适生长温度较低的微生物叫嗜冷菌，最极端的代表生活在永远寒冷的环境中。嗜冷菌已经进化出了一些分子机制使它能在寒冷环境下很好的行使功能，但是这些分子机制可能对高温非常敏感。

◆ 嗜冷菌和耐冷菌有何区别?

◆ 嗜冷菌细胞质膜采用何种分子机制适应寒冷环境，为什么它们是必需的?

6.12 高温下微生物的生长

微小的生命在高温环境（到达和超过沸点）中蓬勃生长。超过 65℃后，就只有原核生命可以生存了，然而即使在这样的环境中也存在着大量的不同种类的细菌和古生菌。下面就来看一下几种高温环境并研究里面的微生物。

高温环境

最适生长温度在 45℃以上的微生物叫嗜热菌（thermophile），在 80℃以上的叫超嗜热菌（hyperthermophile）（图 6.17）。自然界中只有在某些地区才能发现如此高的温度。例如，在白天经受了足够阳光照射的土壤，温度常高达 50℃以上，有些甚至可升至 70℃左右，而地表以下几厘米处温度低的多。发酵原料（如混合肥料）堆和储存饲料的地方，一般温度可达 70℃。但是在自然界中，最广泛的极高温度环境通常还是与火山暴发现象有关。这些现象中特别提到的是温泉。

许多温泉温度接近沸点，喷气孔温度可达 150～500℃。海洋底部热水口温度达 350℃或更高（见 19.8 节）。世界各地都可以见到温泉，但主要集中在美国西部、新西兰、冰岛、日本、地中海地区、印度尼西亚、美国中部、法国中部等地。世界上最大的温泉集中区是黄石国家公园（美国）。

虽然有些温泉温度会改变，但其他大部分全年一直很稳定，一般温度变化也不会超过 1～2℃。除此之外，不同温泉的化学组成和 pH 各不相同，但是一般都含有足够多的营养物质来供嗜热化能无机营养和化能有机营养的微生物群体生长。

温泉中的超嗜热菌

由于海拔高度原因，许多温泉温度都接近沸点（黄石国家公园的热泉温度为 92～93℃，近海平面的热泉温度为 99～100℃）。在滚烫的温泉中（图 6.20）通常存在着一些超嗜热菌。可以利用将载玻片浸没在温泉中几天后取出的方法对这些嗜热菌的生长进行研究。显微观察载玻片可以发现吸附到玻片上的原核单细胞已经形成了菌落并且在玻片上生长。

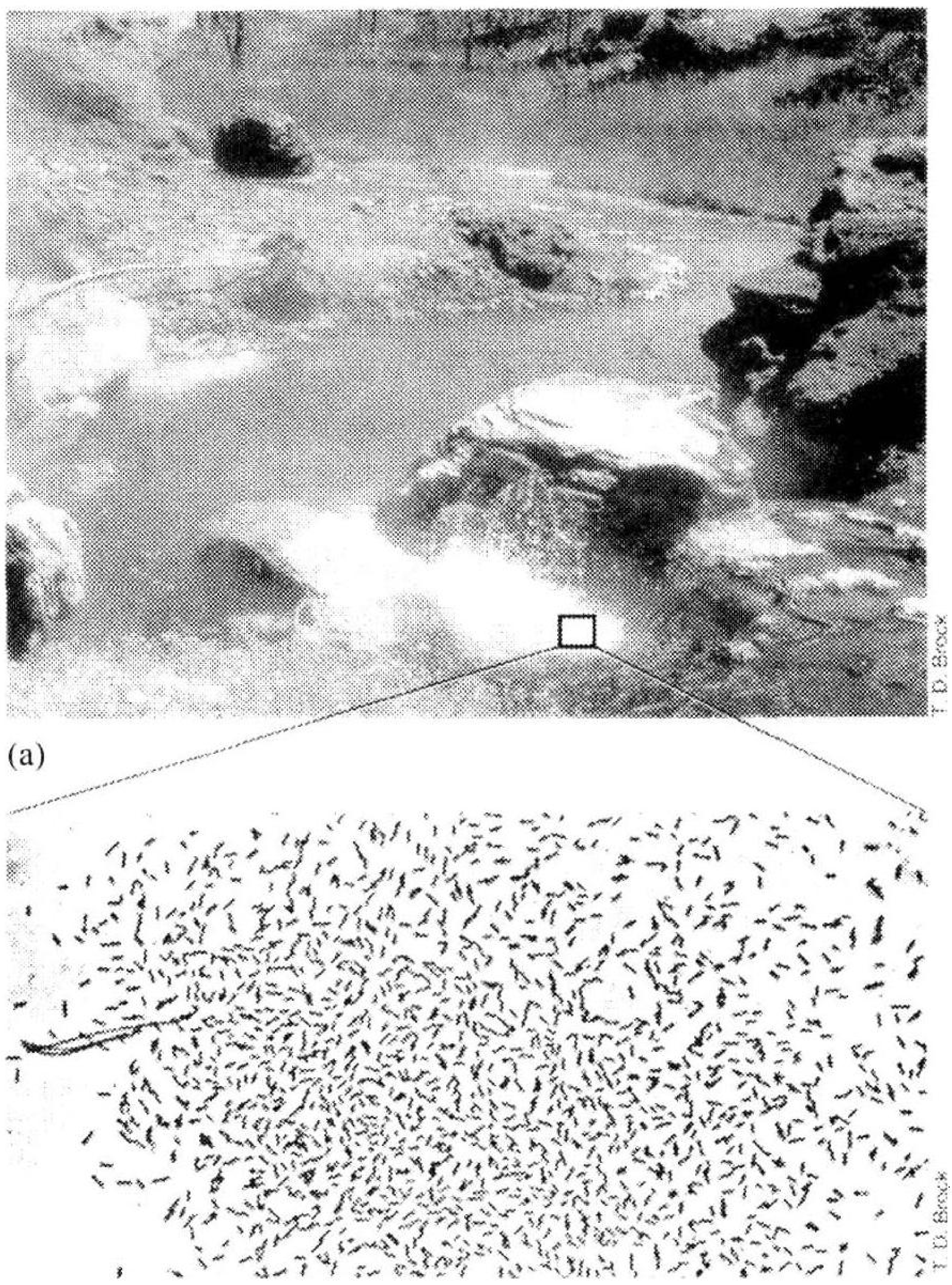


图 6.20 沸水中超嗜热菌的生长。（a）漂石温泉是黄石国家公园的一个小温泉。这个温泉的温度很高，比沸点高 1～2℃。温泉周围的矿物沉积物主要含有硅和硫。（b）将载玻片浸没在图 a 中所示的温泉中，一段时间后在显微镜下就可观察到的所形成的原核生物菌落。

对温泉中的微生物生态学研究发现，它们的生长速率很快，报道的世代时间最短的为 1h。已经获得了很多种这些微生物的培养物，它们具有不同的形态和生理特征（第 13 章）。用核糖体 RNA 所作的系统进化分析发现，这些超嗜热菌中存在着很多分支，既有真细菌也有古生菌。一些古生菌的最适生长温度高于100℃，因此必须在高压容器中进行培养才能获得高于沸点的温度。

嗜热菌

温泉和其他一些高温环境中也存在着很多嗜热菌（最适生长温度为 45～80℃）。当水流出温泉边缘后，就远离水源，越流越远，随之也慢慢变冷生成温度梯度。沿着生成

的温度梯度，许多不同种属的微生物在不同温度范围内开始生长（图6.21）。通过研究沿温泉梯度微生物种属的分布以及检测世界各地不同温度下温泉和其他热聚集地的微生物，就可以确定每一种微生物生存的最高极限温度（表6.1）。从这些信息可以得出以下结论：①原核微生物一般比真核生物生长的温度要高；②所有原核生物中最耐高温的是古生菌中某些属；③非光能营养微生物的生长温度比光能营养微生物的生长温度高。

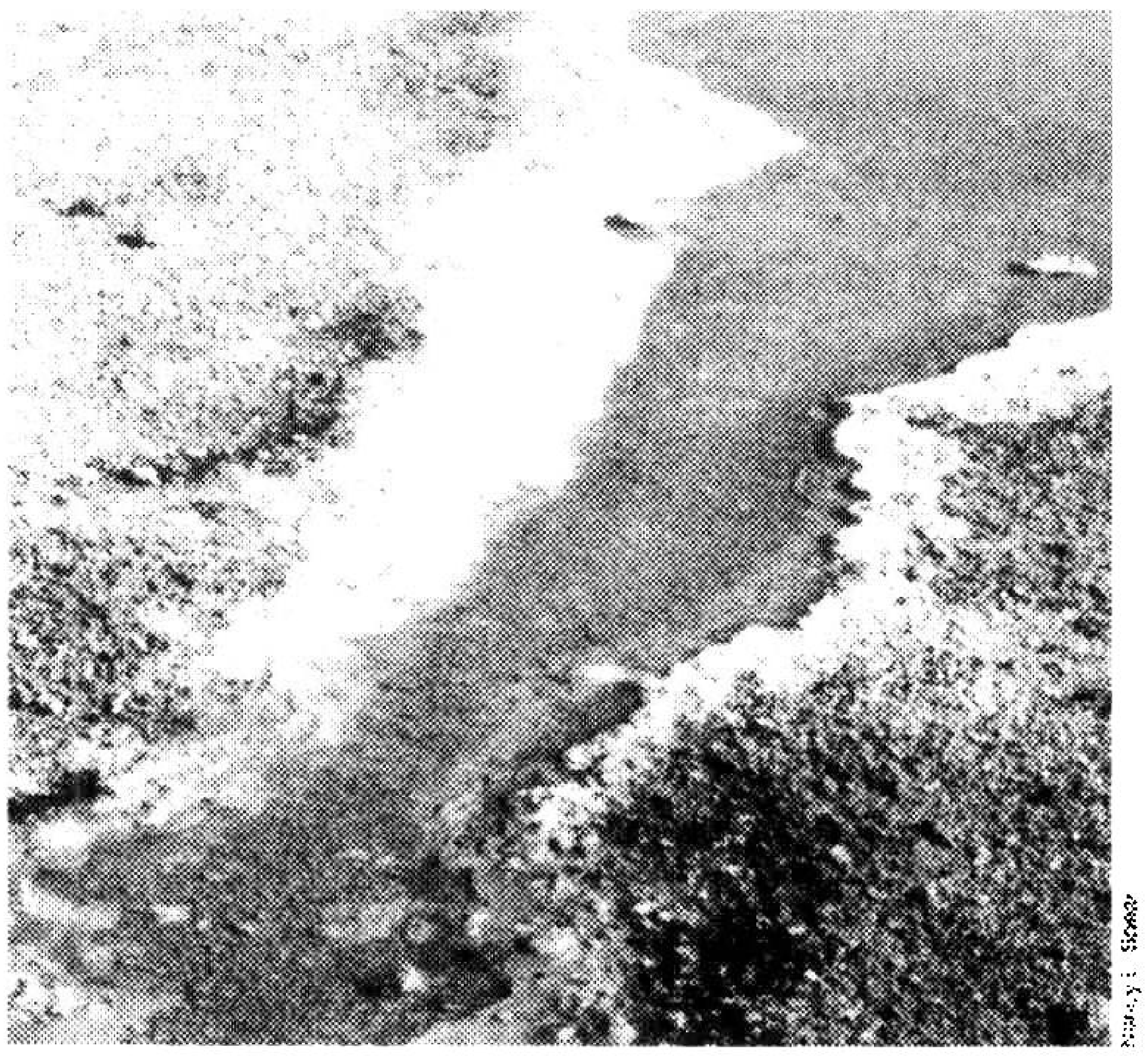


图6.21　黄石国家公园温泉中嗜热蓝藻的生长。由温泉形成的温度梯度上，在温度高于光合生物的情况下有蓝藻形成特征性的V型，因为水流在湖边比湖中心冷却的快。泉水是从图的后面流向前面。亮绿色来自于聚球蓝细菌属（*Synechococcus*）。随着水沿梯度的流动，细胞的密度增加，不太嗜热的菌株加入进来，颜色变得更加绿。

表6.1　目前所知道的生命有机体生长的温度上限

种群	温度的上限/℃
动物	
鱼和其他水生脊椎动物	38
昆虫	45～50
介形类	49～50
植物	
维管束植物	45
苔藓	50
真核微生物	
原生动物	56
藻类	55～60
真菌	60～62
原核生物	
真细菌	
蓝细菌	70～74
不产氧气的光合微生物	70～73
化能有机营养和化能无机营养细菌	95
古生菌	
化能有机营养和化能无机营养古生菌	113[a]

a. 延胡索酸火叶菌（*Pyrolobus fumarii*）生长温度的上限。火叶菌属（*Pyrolobus*）一些种属能在121℃生长。

在人工的高温环境中也发现了嗜热菌。家用或者工业用的加热器温度为55～80℃，是嗜热原核生物生长的理想场所。已经从加热器中分离到了与水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）这种温泉中常见的原核生物（见12.34节）类似的微生物。热电厂工业高温废水及其他的一些人为高温环境也为这些嗜热菌的生长提供了场所。可以通过合适的富集培养方法容易地分离得到这些微生物。

嗜热的分子机制

嗜热菌和超嗜热菌如何能在那么高的温度下存活呢？首先，这些生物中的酶和其他蛋白质比嗜温菌中的酶和蛋白质更具有耐热性，并且实际上这些大分子在高温下都能起到最佳的作用。那么又是如何获得热稳定性的呢？研究嗜热菌的酶发现，它们的氨基酸序列与嗜温菌中催化相同反应的酶的氨基酸序列一般只有很小的差别，很明显，是一个关键的氨基酸代替了存在于此酶中的一个或几个氨基酸，且使此酶以不同的方式进行折叠，从而使此酶能耐受热变性作用。

超嗜热菌蛋白质热稳定性被认为是由于存在的盐桥数目增加及蛋白质高度密集的疏水内部区域造成的结果，这些疏水区域本能地阻止在水环境中去折叠。最后某些嗜高温菌的细胞质中所产生的高水平的可溶性的二磷酸肌醇、二磷酸甘油和甘露糖基甘油酸会协助蛋白质稳定以对抗高温降解。

除细胞中的酶和其他部分以外，嗜热菌和超嗜热菌中细胞质膜必须对热具有稳定性。前面提到在嗜冷菌的膜脂中富含不饱和脂肪酸，这样使膜在低温下具有流动性和起正常作用。与此相反，嗜热菌膜脂中富含饱和脂肪酸，使它们在高温下保持稳定性和正常地起作用。饱和脂肪酸能生成比不饱和脂肪酸更强的疏水键，这些疏水键是造成膜稳定性的主要原因。

实际上超嗜热菌全是古生菌，它们的生物膜脂根本就不包含脂肪酸，而是含有不同长度的由碳氢组成的五碳重复单位——植烷（lipid monolayer）（图4.19c），植烷以醚键连接到磷酸甘油上。除此之外，细胞膜形成的是磷脂单层膜（图4.19d），这一结构无疑要比细菌和真核生物中的双层膜更具有热稳定性。4.5节中仔细讨论了超嗜热菌古生菌中唯一的膜结构，后面将讨论热稳定性的一些其他方面，包括13.12节中超嗜热菌中的DNA。

嗜热和生物技术

人们对嗜热和超嗜热微生物感兴趣不仅仅是由于基础生物学原因，还因为这些微生物可以为工业和生物工艺流程提供一些重要的便利之处。从嗜热和超嗜热菌分离的酶可用来催化高温下发生的生物反应（见30.9节和图30.15），且这些酶通比嗜温菌的酶更稳定，延长了酶储存期限。

一个实际应用的例子就是从水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）分离得到的DNA聚合酶，即*Taq*聚合酶。它是一个具有广泛用途且十分重要的热稳定性酶，此酶可使聚合酶链反应技术（PCR）有关的重复步骤变成自动化，此方法可以使特定的DNA序列片段扩增（见7.9节）。目前已经知道了几种其他热稳定性酶和热稳定产品，并且正开展研究工作以求在工业上加以应用。

概念检查

最适生长温度为45～80℃的有机体叫嗜热菌，在80℃以上的叫超嗜热菌。这些生物生活在温度达到或者高于沸点的环境中及温度超过100℃的海底高温水出口处。嗜热菌和超嗜热菌产生热稳定性的大分子。

◆ 原核生物生长的最高温度为多少？在这样的环境中生长的微生物是细菌还是古生菌？

◆ 超嗜热菌古生菌的细胞膜结构如何？为何这种结构适应高温环境？

◆ 何谓 *Taq* 聚合酶？为什么它在生物技术上有很大用途？

V 环境对微生物生长的影响：pH、渗透性和氧气

温度对微生物的生长起主要的影响，其他因素也影响微生物生长。其中主要因素为pH、渗透压和氧气。我们会看到就如同微生物的生长具有最适温度一样，对于其他因素也有最适条件，或者从一个极端走到另一个极端。首先来看一下 pH，它是有机体环境中酸性的反应。

6.13 低 pH 和高 pH 情况下微生物的生长

溶液的酸碱度常用 pH 来表示，中性用 pH 7 表示（图 6.22）。pH 小于 7 的称为酸性，大于 7 的称为碱性。pH 是用对数函数来表示的，pH 变化 1 个单位就意味着 H^+ 浓度发生了 10 倍的变化。因此，乙酸的 pH 接近于 2，而家用氨的 pH 接近于 11，二者的 H^+ 浓度相差百万倍。

pH 和微生物生长

每种生物能在一定 pH 范围内生长，但都有最适 pH。多数微生物表现出来对 pH 变化范围为 2～3 个单位。许多自然环境的 pH 为 5～9，而大部分微生物最适 pH 都在这个范围内。只有少数几个种属微生物能在 pH 低于 2 或大于 9 的环境中生长。能够在低 pH 环境中生长的生物体叫嗜酸菌（acidophile）。真菌比细菌更倾向于耐酸。许多真菌生长的最适 pH 为 5 或更低一些，只有少数几种能在 pH 2 的环境中很好的生长。有几种细菌也是嗜酸性，而且这些细菌中某些是专性嗜酸的，不能在中性 pH 条件下生长。专性嗜酸细菌包括：硫杆菌属（*Acidthiobacillus*）（见 12.4 节）及古生菌中几个属［包括硫化叶菌属（*Sulfolobus*）、热原体属（*Thermoplasma*）和铁原体属（*Ferroplasma*）］（见 13.5 节和 13.9 节）。

控制嗜酸性的最重要的因素就是细胞膜的稳定性。当 pH 升到中性时，专性嗜酸菌的细胞质膜实际上会溶解，且细胞也会解体，也就暗示膜稳定性实际上需要高浓度的 H^+。例如，已经知道最为嗜酸的原核生物是星名氏嗜酸菌（*Picrophilus oshimae*）生活的最适 pH 为 0.7，pH 高于 4 的时候细胞就会裂解。它的生活环境为火山喷发后形

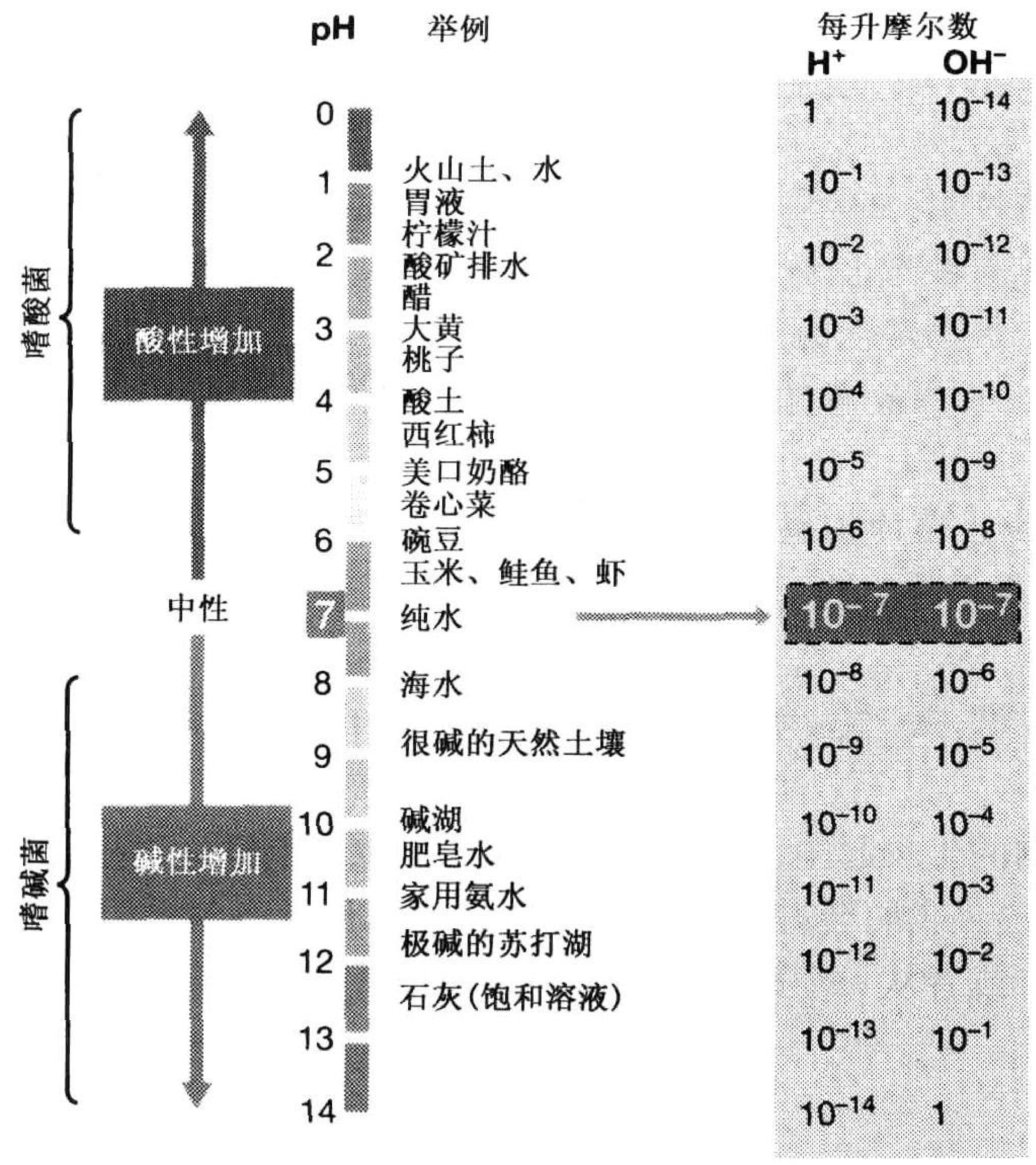


图 6.22　pH 范围。需注意的是虽然微生物能在极低或极高 pH 环境下生长，但细胞内部 pH 却接近中性。

成的极端酸性的土壤（见 13.5 节）。

有几种微生物最适生长 pH 较高，有的高达 10，这样微生物就被认为是嗜碱菌（alkaliphile）。通常可以在高度碱性栖息地（如纯碱湖和高碳土壤）中发现嗜碱菌。研究的许多嗜碱性原核生物是芽孢杆菌属（*Bacillus*），如坚强芽孢杆菌（*B. firmus*）。这种微生物是嗜碱菌，但它的生活环境的 pH 范围比较广，为 7.5～11。一些极端嗜碱细菌也是嗜盐菌（喜盐的），并且很多也是古生菌（见 13.3 节）。某些嗜碱菌已经在工业中加以应用，因为它们能产生水解酶，如蛋白质水解酶，在碱性条件下它的功能发挥最好，这种酶也用于家庭去垢剂（见 30.9 节）。

由于在高 pH 环境中生活面临着很多的生物能学问题，因此嗜碱菌也非常引人注意，如在细胞质外高 pH 情况下能够建立起质子动力（见 5.12 节）吗？通过研究 *B. firmus* 人们发现，是钠离子的梯度而不是质子动力为细胞的运动和运输提供动力，但是同时也产生质子动力，这些质子动力主要用于合成 ATP。到底这些现象是如何发生的？这是现在研究嗜碱菌的一个有趣的问题。

细胞内部 pH

最适生长所用 pH 只代表了细胞外（extracellular）环境的 pH，而细胞内（intracellular）环境 pH 必须接近中性，以防止那些对酸或碱易变性的大分子受到破坏。对于大多数生长最适 pH 为 6～8［指嗜中性微生物（neutrophile）］的微生物来讲，其细胞

质膜保持中性或极接近中性（图 6.22）。然而，嗜碱性和嗜酸性微生物内部 pH 可能会有所变化。例如，前面所提到的嗜酸菌星名氏嗜酸菌，人们测量的内部 pH 为 4.6，而极端嗜碱菌的内部 pH 为 9.5。如果这不是细胞质 pH 的下限和上限的话，也应该接近于这个数值，因为超过这个范围后大分子的稳定性就会受到很大影响。

缓冲液

在分批培养的微生物生长过程中，由于代谢反应消耗或产生一些酸性或碱性物质，所以 pH 也会改变。因此经常需要一种称为缓冲液的化学物质加入到微生物培养基中，以维持相对恒定的 pH。然而，某种 pH 缓冲液一般只缓冲很窄的 pH 范围（pH 6～7.5），因此一般必须使用多种缓冲液来缓冲 pH 的变化。

对于接近中性的 pH，一般使用 KH_2PO_4 缓冲液，它是一种极好的缓冲剂。微生物培养基所使用的或对微生物酶进行分析所使用的许多其他缓冲试剂都可以在市场上买到。一个生物体或酶所使用的最佳缓冲系统与另一个生物体或酶所使用的最佳缓冲系统有很大的不同之处。虽然在玻璃器皿中对酶进行分析时，一种特定的缓冲剂对从一种生物中得到的酶能很好地进行分析，对来自另一种生物体的相同酶也能正常地进行分析，但是在特定情况下所使用的最佳缓冲系统必须通过实验确定。

概念检查

环境的酸碱性能很大程度上影响微生物生长。某些微生物能在低或者高 pH 的环境中生长，但是大多数微生物在 pH6 和 pH8 生长的最好。即使细胞的外部 pH 为强酸或者强碱性，但细胞的内部 pH 必须保持相对稳定。

- ◆ 当 pH 从 7 降到 4 的时候，质子的浓度增加多少？
- ◆ 什么是缓冲液为什么需要它？

6.14 渗透效应对微生物生长的影响

就如前面所了解到的，水是溶剂，所有生物体都需要水，在自然界中水的利用率是影响微生物生长的一个非常重要的因素。水的利用率不仅仅决定于环境中含水量的多少，也就是微生物生存的栖息地有多湿或多干，还决定于溶解物浓度，如盐、糖或其他能溶于水的物质。这是因为，溶解的物质对水具有亲和力，与溶解物结合的水就不能再被生物体利用。

水活度和渗透

一般在物理上表示水的利用率的术语是水活度（water activity）。水活度简写为 a_w，是指物质或溶液达到平衡时，空气蒸汽压力与相同温度下纯水蒸气压力之比。因此 a_w 值为 0～1，表 6.2 列出了一些有代表性的 a_w 值。农用土壤中水的活度为 0.90～1.00。

表 6.2　几种物质的水活度

水活度(a_W)	物质	代表性有机体[a]
1.000	纯水	柄杆菌属(*Caulobacter*)、螺菌属(*Spirillum*)
0.995	人类血液	链球菌属(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*E. coli*)
0.980	海水	假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)
0.950	面包	大多数的革兰氏阳性杆菌
0.900	槭糖浆、火腿	革兰氏阴性球菌[如葡萄球菌属(*Staphylococcus*)]
0.850	意大利腊肠	鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii*)
0.800	果酱和水果饼	拜耳酵母(*Saccharomyces bailii*)、青霉菌属(*Penicillium*)
0.750	盐湖和咸水鱼	盐杆菌属(*Halobacterium*)、盐球菌属(*Halococcus*)
0.700	谷物、糖果和干燥的水果	耐旱真菌(*Xeromyces bisporus*)和其他的好干燥真菌

a. 挑选的这些原核和真核微生物能在标明水活度的培养基中生存。

渗透过程中（见 4.8 节和图 4.32），水可以从高水浓度区（低溶质浓度）向低水浓度区（高溶质浓度）扩散。很多情况下，细胞质都比环境含有较高浓度的溶质，所以水倾向于扩散进入细胞，这样就认为细胞处于正水平衡。但当细胞处于低水活度的环境中，水就倾向于流出细胞。如果细胞无法处理这种情况就会引起严重的问题。

嗜盐菌和相关微生物

自然界中，需要考虑渗透作用的主要是处于高盐浓度环境中的栖息地。海水含大约3%的 NaCl，再加上一些少量的其他矿物质和元素。在海水中发现的微生物，一般除了能在海水的水活度下最适生长以外，对 NaCl 都有一特殊需求（图 6.23），这种微生物叫嗜盐菌（halophile）。嗜盐菌生长至少都需要一些 NaCl，但根据微生物类型不同，最适生长所需要的 NaCl 量也不一样，因此可以用轻度嗜盐菌（mild halophile）和中度嗜盐菌（moderate halophile）这样的术语来描述嗜盐菌对 NaCl 的需求，前者一般需1%～6%的 NaCl，而后者却需 7%～15%的 NaCl（图 6.23）。

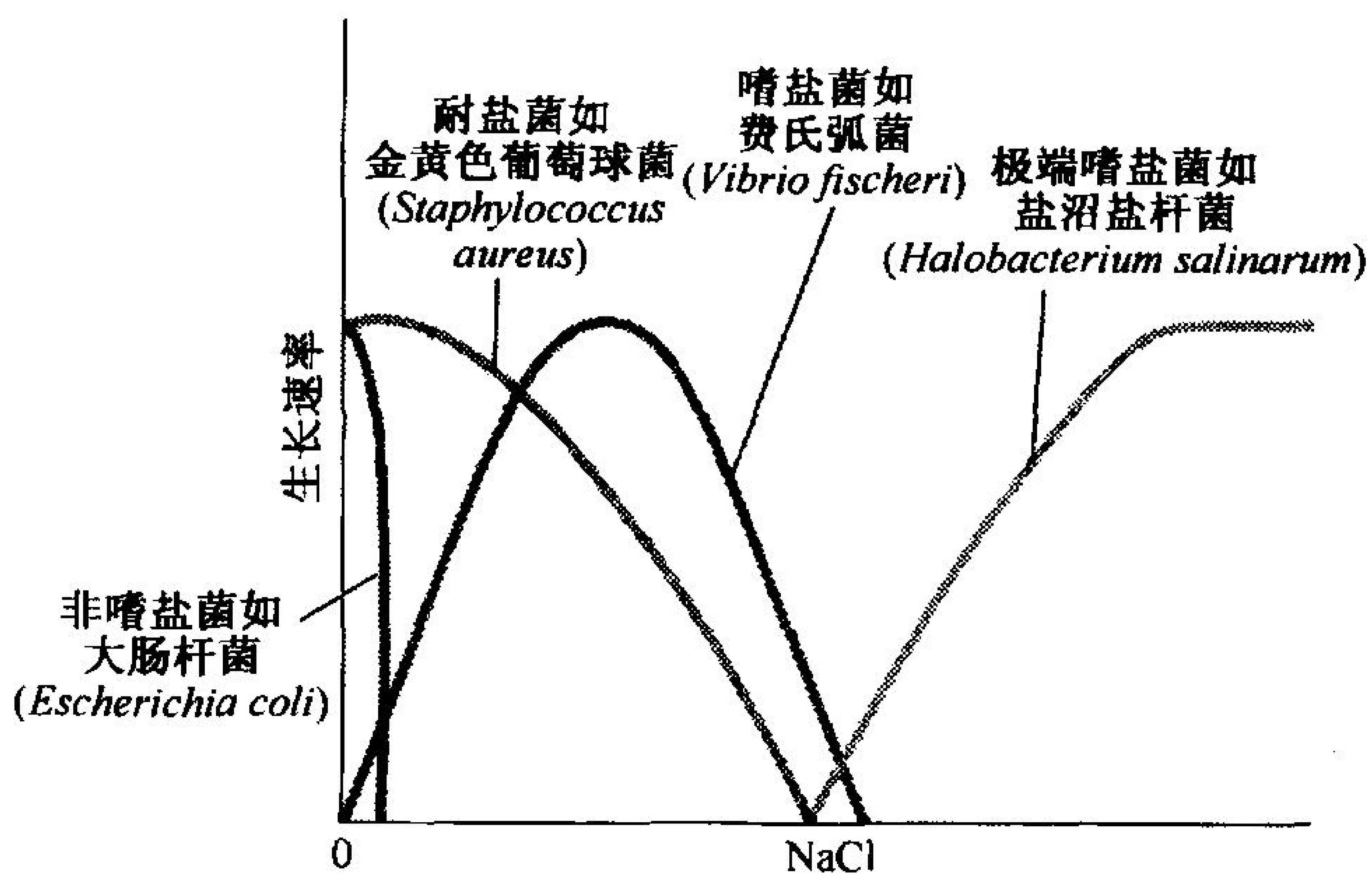


图 6.23　NaCl 浓度对耐盐微生物生长的影响。对海洋微生物如费氏弧菌（*V. fischeri*）而言，最适 NaCl 浓度约 3%；对极端嗜盐菌而言最适 NaCl 浓度为 15%～30%。

许多微生物不能适应水活度极低的环境，因此在那种环境条件下死亡，要么变得脱水，要么长期休眠。耐盐生物体可以忍受它们所处环境中水活度的减小，且一般在没有额外溶质存在的情况下都能很好地生长（图 6.23）。相比之下，有些微生物在水活度极低的情况下能够生存下来，它们能适应那样的环境条件，无论从生存角度考虑，还是从应用角度考虑（如食品工业中盐和蔗糖常用作食品添加剂来抑制微生物生长）都是非常令人感兴趣的。

能在极高盐环境中生长的微生物叫极端嗜盐菌（extreme halophile）（图 6.23），极端嗜盐菌最适生长需要 15%～30% NaCl（见 13.3 节）。能够在高糖环境中生长的微生物叫嗜高渗菌（osmophile）。能够在极干燥环境中（极缺水）生长的微生物叫嗜干菌（xerophile）。表 6.2 列出许多这些生物体的例子。

相容性溶质

生物体为何能在水活度低的环境中生长呢？当生物体在水活度低的培养基中生长时，它可以通过增加细胞内溶质的浓度而从环境中获取水。可以通过细胞内的“泵”把无机离子从环境中泵入细胞内，或合成或浓缩有机物质来增加细胞内部溶质浓度。生物体就是使用这些机制中任何一种来提高细胞内部溶质浓度的，表 6.3 列出几种例子。

表 6.3 微生物体中相容性溶质

有机体	积累的主要溶质	生长的最低水活度 a_w
细菌和非光合生物	甜菜碱、脯氨酸（大多数革兰氏阳性菌）、谷氨酸盐（大多数革兰氏阴性菌）	0.97～0.90
淡水蓝藻	蔗糖、海藻糖	0.98
海水蓝藻	α-葡糖基甘油	0.92
海水藻类	甘露醇、各种苷类、脯氨酸、β-二甲基巯基丙酸内盐	0.92
盐湖蓝藻	甜菜碱	0.90～0.75
嗜盐、不产生氧气的光合细菌（外红硫螺菌属 *Ectothiorhodospira*/*Halorhodospira*）红弧菌属（*Rhodovibrio*）	甜菜碱、海藻糖、1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸	0.90～0.75
极端嗜盐古生菌（如盐杆菌属 *Halobacterium*）和一些细菌（如 *Haloanaerobium*）	KCl	0.75
嗜盐绿藻（*Dunaliella*）	甘油	0.75
嗜干燥酵母	甘油	0.83～0.62
嗜干燥丝状真菌	甘油	0.72～0.61

细胞内，调节细胞质水活度所用的溶质必须是对细胞的生物化学过程没有抑制作用的，这些溶质叫相容性溶质（compatible solute）。已经知道在微生物体内存在几种不同的相容性溶质（表 6.3 和图 6.24），这些物质都是强水溶性的糖、酒精及乙醇、氨基酸或它们的衍生物（图 6.24）。在极端嗜盐古生菌和少数极端嗜盐细菌中主要是 K^+（以

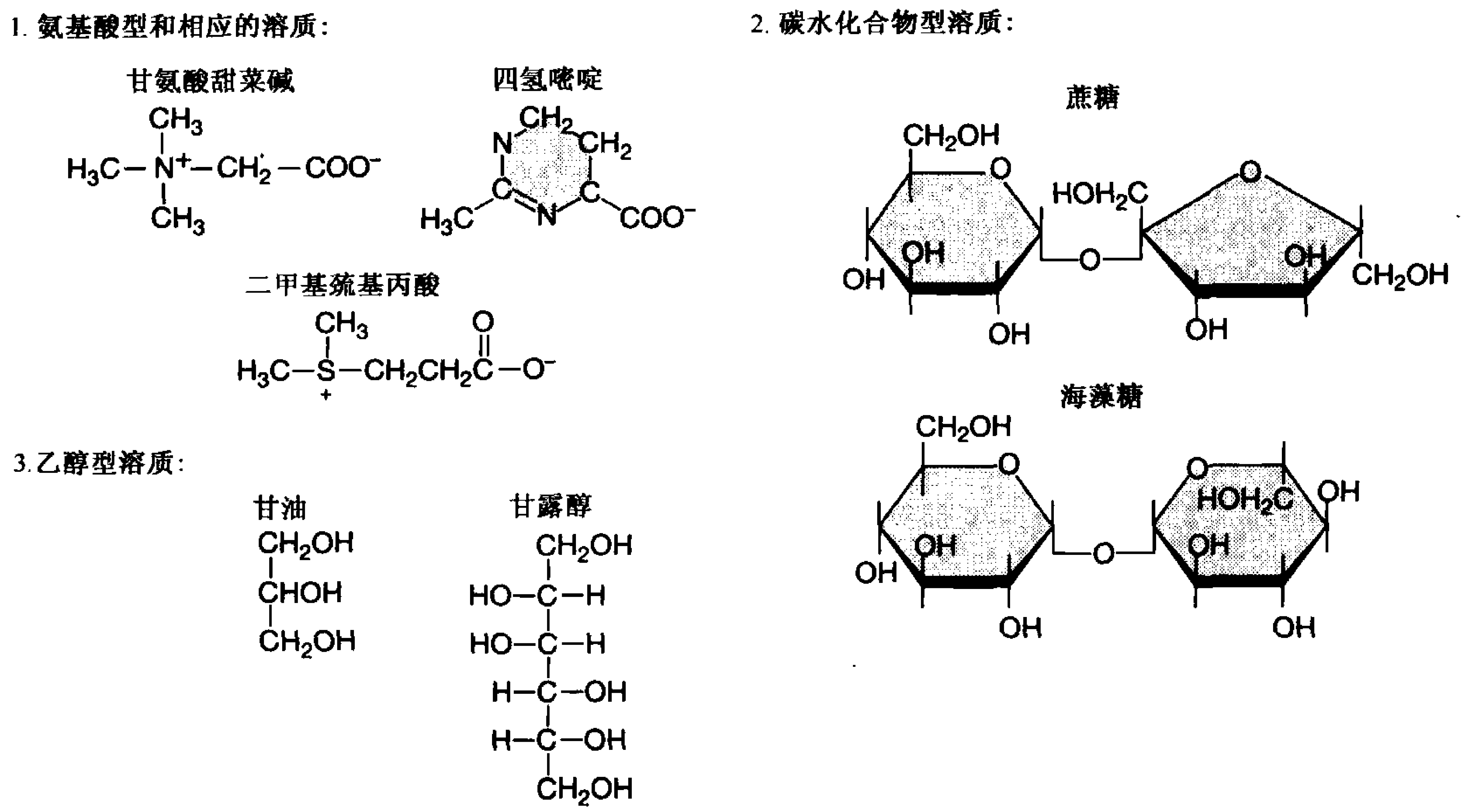


图 6.24 微生物体中存在的一些共同的相容性溶质的结构图。图 3.12 中图示了谷氨酰胺、脯氨酸及其他相容性溶质的结构。ectoine 正式的名称为：1，4，5，6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸。甘氨酸三甲内盐和 β-二甲基巯基丙酸内盐是海洋藻类中常见的溶质。

KCl 形式存在）。

这些相容性溶质或者直接由微生物合成，或者在一些情况下（如甘氨酸三甲内盐或 KCl）是从外环境积累而来。相容性溶质在细胞内的浓度随着外来溶质含量而变化。在每一个生物体中，能产生或积累的最大量相容性溶质直接反映了此生物体的一个遗传特征。因此，不同的生物体能够耐受不同程度的水含量（表 6.2 和表 6.3）。在某种程度上，根据生物体产生或积累相容性溶质的遗传能力不同，可把它们分为：非耐盐生物、耐盐生物、嗜盐生物和极端嗜盐生物。

葡萄球菌属（*Staphylococcus*）的革兰氏阳性球菌是众所周知的耐盐细菌（实际上采用了一般的分离措施，使用含 7.5%NaCl 培养基），这些微生物利用氨基酸（如脯氨酸）作为相容性溶质。甘氨酸三甲内盐是甘氨酸的衍生物，甘氨酸的氨基上的质子被三个甲酰基所代替，这样是 N 原子上带上了永久的正电荷（图 6.24），增加了它的水溶性。甘氨酸三甲内盐是一种广泛分布的相容性溶质，尤其在嗜盐菌和蓝绿藻中（表 6.3）。

一些极端嗜盐菌可产生一种新的相容性溶质，叫 1，4，5，6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸（ectoine）（图 6.24），它是环化的脯氨酸衍生物（图 6.25）。海藻可产生许多不同的糖苷和 β-二甲基巯基丙酸内盐，但它们只能积累少量糖苷，因为藻类细胞不是非常嗜盐性的。嗜干（xerophile）的酵母菌和嗜盐的绿藻主要产生甘油作为它们的相容性物质。表 6.3 列出了其他种类的相容性溶质，图 6.24 是它们的结构示意图。

概念检查

当环境中的可溶性溶质的浓度增加时，水的活度成为生物体生长的限制因素。为了应对这种情况，生物体会产生或者积累一些细胞内相容性溶质来维持细胞的正向水平衡。有些微生物已经可以在很低的水渗透力情况下生存，有些甚至需要高水平的盐才能生长。

◆ 什么是纯水的 a_w？

◆ 什么是相容性溶质，为什么需要它？

◆ 什么是嗜盐细菌的相容性溶质？

6.15 氧气和微生物生长

人类必须有氧气才能生存，因此人们很容易会认为所有的生物体都需要氧气才能生存。但是，事实上并非如此，有些生物可以在缺氧的情况下生存。

氧气在水中的溶解度很小，微生物在水中或者是在潮湿的环境中（尤其那些含有充足有机物的环境中）进行呼吸作用，氧气很快被消耗掉。因此，无氧（anoxic）的生活环境在自然界中是很常见的，包括泥巴、沉积物、沼泽、湿地、充满水的土壤、动物的

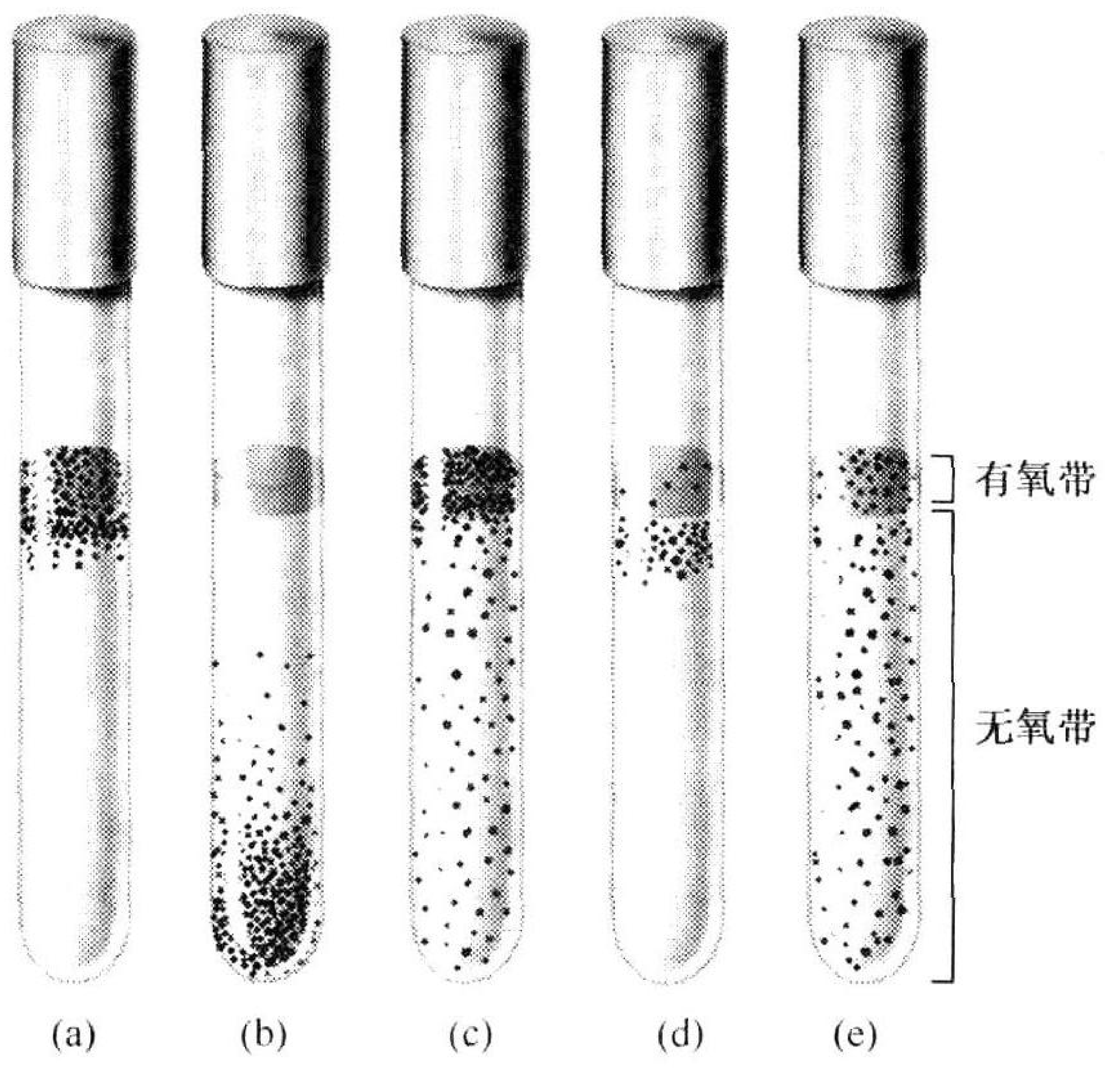


图 6.25　微生物生长和氧气浓度。好氧、厌氧、兼性好氧、微好氧及厌氧耐氧微生物生长情况，显示出了在试管内培养基中微生物菌落的生长部位。在液体培养基中加入了少量的琼脂以防止液体晃动，且加入了氧化还原指示剂刃天青，当被氧化时它就可以变成粉红色，当被还原时就变成无色。(a) O_2 只渗透到试管内部很浅部位，所以专性好氧菌只在表面生长。(b) 厌氧菌对 O_2 敏感，只在远离表面的部位生长。(c) 兼性好氧菌在氧存在或不存在情况下都能生长，因此整个试管都能生长。(d) 微好氧菌在远离氧含量最高的部位生长。(e) 耐氧厌氧菌可在整个试管内生长，但是接近表面的地方的微生物生长不好，因为这些微生物只能进行发酵。

肠道、污泥、地球的表面深层和许多其他的环境。在这些无氧环境中，微生物尤其是各种不同的原核生物在顽强地生长着。

微生物的氧气分类

微生物对氧的需求或忍耐能力有很大的不同。依据对氧的作用，可以把微生物分成几类，见表 6.4 所述。好氧菌（aerobe）是指能在氧浓度到达完全氧分压（空气中含 21%O_2）的情况下生长的微生物。许多生物甚至能忍受高浓度的氧（高压氧）。相比之下，微好氧菌（microaerophile）只有在氧气较稀薄的空气中时才利用氧，这通常是因为它们吸收氧的能力有限及它们含有一些对氧敏感的分子，如对氧敏感的酶。许多需氧的生物是兼性的，意味着在合适的营养和培养条件下它们既可以在有氧的环境下生存也可以在无氧的环境下生存。

表 6.4 微生物与氧气关系

微生物类群	与氧气的关系	代谢类型	举例[a]	生境[b]
好氧菌				
专性	需要	有氧呼吸	黄色微球菌（*Micrococcus luteus*）(B)	皮肤、尘土
兼性	不需要，但是有氧气时生长的更好	有氧呼吸、无氧呼吸和发酵	大肠杆菌（*E. coli*）(B)	哺乳动物大的肠道
微好氧	需要氧气，但是氧气的含量要比大气压低	有氧呼吸	螺旋菌（*Spirillum volutans*）(B)	湖水
厌氧菌				
耐氧	不需要，有氧气存在的情况下生长的不好	发酵	酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）(B)	上呼吸道
专性	有害或者是致命的	发酵或者是无氧呼吸	甲酸甲烷杆菌（*Methanobacterium formicicum*）(A)	污泥、污水的消化池、无氧气的湖底的沉积物

a. 括号中的字母表示的是系统地位（B. 真细菌；A. 古生菌），原核生物域中的代表在每个种类中都是已知的。大多数真核生物是专性好氧的，也有一些兼性好氧菌（如酵母）和专性厌氧菌（如某些原生动物和真菌）。

b. 表中列出的是微生物的典型生境。

某些有机体不能吸收氧气。这些微生物叫做厌氧菌（anaerobe）。有两种厌氧生物：一种是耐氧厌氧菌（aerotolerant anaerobe），它可以忍受氧存在并能在氧存在情况下生长，但却不能利用氧；另一种是专性厌氧菌（obligate anaerobe），它们可以被氧抑制或杀死（表 6.4）。专性厌氧生物能被 O_2 杀死的可能原因是不能把氧代谢的某些毒性产物去除（见 6.16 节）。

到目前为止，专性厌氧（obligate anaerobiosis）存在于三类不同微生物中，包括各种不同种类的原核生物、少数几种真菌和一些原生动物。最有名的专性厌氧细菌属于梭菌属（*Clostridium*），它们是一类革兰氏阳性的产内生孢子的杆菌。梭状芽孢杆菌广泛分布于土壤、湖泊沉积物和肠道中，经常引起罐装食品的腐败（见 12.20 节和 29.2 节）。在产甲烷菌和很多其他种类的古生菌、硫还原菌和同型产乙酸细菌（第 12 章和第 13 章）及生活在肠道中的许多细菌（见 21.4 节）中也会发现其他的一些专性厌氧菌

（第 13 章）。专性厌氧菌对氧气的敏感程度不同，有些种类能够忍受痕量的氧气甚至可以暴露在氧气中，而另外一些则不能。

厌氧菌和好氧菌的培养技术

对许多好氧生物而言，必须供给足够的通气量。因为在生物体生长过程中 O_2 被耗尽后，不会立即从空气中通过扩散而得到补充。因此经常需要向培养基中强制性地通气，通过振荡器剧烈振荡摇瓶或试管获得 O_2，也可以通过一个优质的玻璃管或多孔玻璃盘把无菌空气通入培养基内。一般好氧生物在强制性地进行通气情况下比只通过简单的氧扩散生长要好得多。

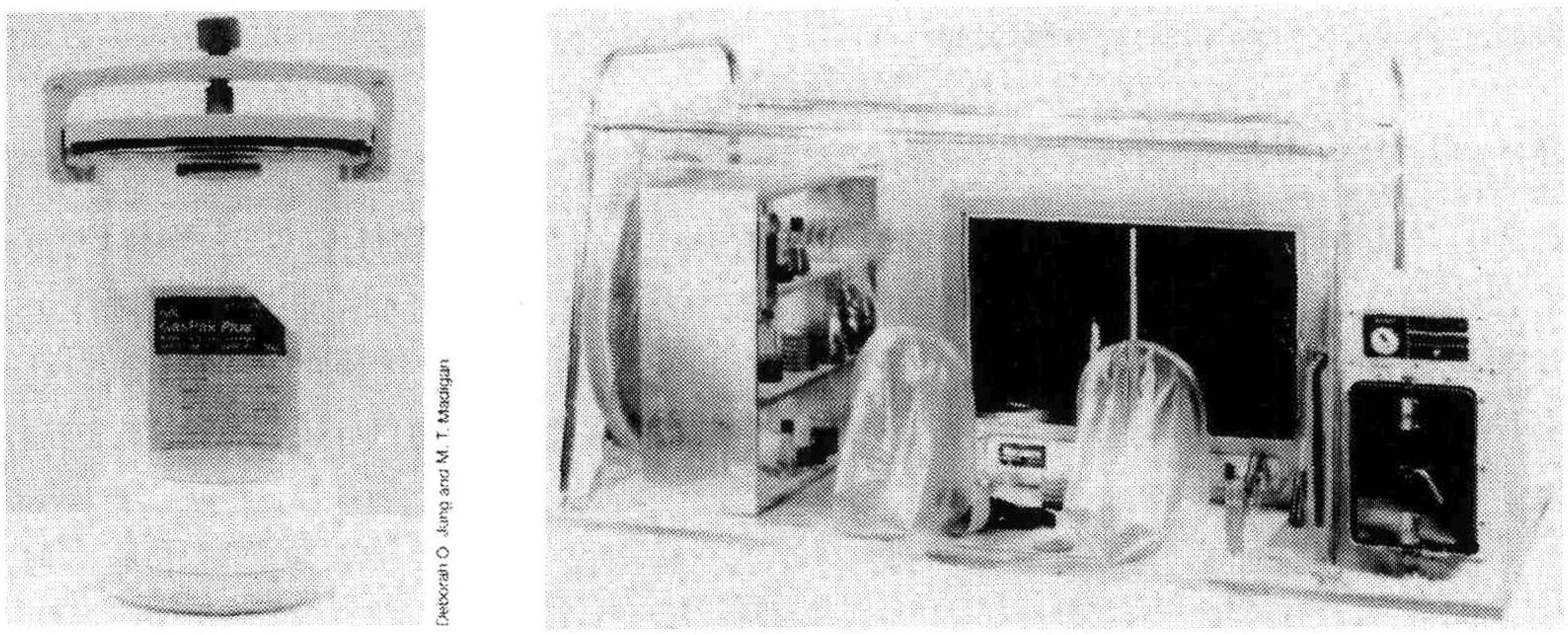
对厌氧培养基而言，问题是如何排除 O_2 而不是提供 O_2。因为氧在空气中是普遍存在的，因此培养厌氧生物需要用特殊方法。专性厌氧生物对 O_2 的敏感性有很大的不同，有许多措施可去除培养基中的氧，一些简单的方法主要适用于对 O_2 不太敏感生物体，其他较为复杂的措施对专性厌氧生物生长来说却是非常必要的。

把摇瓶和试管盛满培养基，并紧紧地盖上合适的塞子，就可以为那些对少量氧不太敏感的生物体提供缺氧条件。也可以加入称为还原剂的化学物质，它能与 O_2 起反应，把 O_2 还原成 H_2O，此方面一个很好的例子就是巯基乙酸盐，把它加入到培养基中形成硫甘醇肉汤，这种培养基一般用于检测生物体对氧的需求情况（图 6.25）。

硫甘醇与整个试管中的氧发生反应后，只有在与空气接触的试管顶部的培养基处才会有氧进入。专性好氧菌只能在这种试管顶部生长。兼性需氧菌可以在整个试管内部生长，但在靠近试管顶端部位长得最好。微好氧菌在接近试管上部生长，但并不是在顶部长得最好（图 6.25）。厌氧菌只在接近试管底部生长，即 O_2 不能渗透到达试管底部（图 6.25）。刃天青（resazurin）是一种氧化还原反应的指示染料，把它加到培养基中，当 O_2 存在时，此染料就会改变颜色，从而可以显示出 O_2 渗透到培养基中的程度。

为了培养厌氧菌，需要除去培养液中的微量 O_2，可以在盛有试管或平皿的罐中放置一个耗 O_2 装置。其中最简单的装置就是厌氧罐，它是一个带密封口的具有厚壁的罐，里面放置着培养微生物所需要的试管、平皿及其他容器（图 6.26a）。这个罐里的空气被 H_2 和 CO_2 所替换，在有化学催化剂存在的情况下，留在容器或培养基中微量的 O_2 也被消耗掉，因此就可以形成厌氧环境。

对于专性厌氧菌（如产甲烷细菌）（见 13.4 节和 17.17 节）而言，不仅需要小心地除去微量 O_2，而且必须在一个无氧的环境中进行培养液的所有操作，这种微生物如果暴露在 O_2 中很短一段时间就会被杀死。在这种情况下首先需要把培养基煮沸，使培养基中的结合氧变成无氧状态，后加入一种还原剂（如 H_2S），最后在无氧情况下把此混合物密封起来。所有操作都必须在一个微小的喷氩气或氮气的管口进行，这样可以驱除任何有可能进入容器的 O_2。为了深入研究厌氧微生物，安装了手套的特殊盒子叫厌氧手套箱，这样可以在完全无氧的空气中进行培养基的操作（图 6.26b）。



(a) (b)

图 6.26 无氧条件下的培养。(a) 无氧罐。其中发生的化学反应产生了氢气和二氧化碳。生成的氢气与罐中的氧气在催化剂铂作用下生成水，最终的空气包含氮气、氢气和二氧化碳。(b) 在有氧条件下，进行接种和操作培养液所使用的厌氧手套袋。气塞在右边，它可以被排空和装满无氧气体，可以作为来回从手套袋加入和移去原料的出入口。

概念检查

好氧菌需要氧气才能生活而厌氧菌则不能利用甚至被氧气杀死。兼性菌在有氧和无氧的条件下都能生存。需要一些特殊的技术来培养好氧菌和厌氧菌。

- ◆ 何谓兼性好氧菌？
- ◆ 还原剂如何起作用？

6.16 氧气的毒性形式

氧既是一种强的氧化剂，又是呼吸作用中一种极好电子受体（见 5.11 节）。同时，氧气对某些微生物而言可能是有毒的。为什么？从本质上讲，氧气本身不是毒性物质，真正的毒性物质是氧气的衍生物，它们会对微生物产生毒害作用。下面我们就来讨论一下这些内容。

氧化学

正常氧的基础状态是指三连体氧（triplet oxygen）（$^3O_2$）。然而还存在着其他的电子构象。一种有毒性的氧形式是单体氧（singlet oxygen）（$^1O_2$），是氧的较高能量形式。在这种形式中，外层电子围绕着原子核变成强反应性的电子，能够进行许多自发的不合乎需要的氧化反应。单体氧既可以通过光化学反应产生又可以通过生物化学产生，在生物化学中是通过不同的过氧化酶催化产生。微生物经常可以遇到单体氧，如空气中传播的细菌和光能营养微生物，它们都含有类胡萝卜素（carotenoid）的颜色，它的作用是把单体氧变成无毒形式（见 17.3 节）。

其他强毒性氧包括超氧负离子（O_2^-）（superoxide anion）、过氧化氢（H_2O_2）（hydrogen peroxide）及羟自由基（OH·）（hydroxyl radical），这些都是在呼吸过程中 O_2 还原成 H_2O 时偶然产生的副产品（图 6.27）。核黄素蛋白、醌、硫醇类及铁-硫蛋白（见 5.11 节）也能把 O_2 还原成 O_2^-。因此，无论它们能不能利用氧气（表 6.3），实际上所有的细胞都不时地暴露在这些有毒物质之下。

细胞内超氧化物都是强氧化性的，实际上能使任何一种有机化合物氧化，包括生物大分子。像 H_2O_2 这样的过氧化物能损害细胞组分，但不像细胞内的超氧化物或羟自由基对细胞那么有毒性。羟自由基是所有毒性氧形式中最具有反应活性的，能氧化细胞内任何一种有机物质。但是，在许多细胞内羟自由基只是一种过渡形式，因为它的主要来源是离子化射线，但细胞一般不能暴露在离子化射线下。少量的羟自由基也能从 H_2O_2 产生（图 6.27），但当过氧化物不在细胞内积累时（由于过氧化氢酶的分解，后面讨论），实际上就消除了羟自由基的来源。后面我们将了解动物体内特殊的免疫细胞，它产生不同的毒性氧杀死入侵的微生物（见 22.2 节）。

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \quad \text{过氧化物}$$
$$O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \quad \text{过氧化氢}$$
$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH\cdot \quad \text{羟基自由基}$$
$$OH\cdot + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \quad \text{水}$$

$$\text{总反应：} O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$

图 6.27　通过逐步增加电子将氧气还原成水的 4 电子还原反应。所有的中间产物都具有反应活性，都对除了水以外的其他细胞结构有毒性作用。

能破坏毒性氧的酶

既然存在一系列有毒的氧衍生物，也就不惊奇生物体已经演变并产生了破坏特定氧化产物的酶（图 6.28）。这些酶中，最普遍的是过氧化氢酶（catalase），它可以攻击过氧化氢中的氢，图 6.28a 和图 6.29 表示过氧化氢酶的活性。另一个对过氧化物起作用的酶是过氧化物酶（peroxidase）（图 6.28b），它与过氧化氢酶的不同之处是需要 NADH 作为还原剂，以 H_2O 作为产物。过氧化物也可以被超氧化物歧化酶（superoxidase dismutase）（SOD）分解破坏（图 6.28c），它可以使 2 分子的超氧化物结合成 1 分子的 H_2O_2 和 1 分子 O_2。超氧化物歧化酶与过氧化氢酶共同作用可以把超氧化物转化为 O_2（图 6.28d）。

好氧菌和兼性好氧菌一般既含有超氧化物歧化酶又含有过氧化氢酶，只有少数几种专性好氧菌缺少过氧化氢酶。在好氧菌细胞内，超氧化物歧化酶是不可缺少的。在专性厌氧菌细胞内，这种酶含量很少（或完全没有），这也许是为什么氧对它们产生毒性的主要原因。一些耐氧厌氧菌（如乳酸细菌），也缺乏超氧化物歧化酶，但它们可以以某种方式利用无蛋白质的锰酸盐复合物体进行 O_2^- 的歧化作用，生成 H_2O_2 和 O_2。在古生物中，这样一种反应或许是执行超氧化物歧化酶功能最原始的形式。所有已知的 SOD 都含有一个金属辅助因子，一般是 Mn^{2+}，也有 Fe^{2+}、Cu^{2+} 与 Zn^{2+}，它们都处于酶的催化位点，这也证明了以上结论。

(a) 过氧化氢酶:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

(b) 过氧化物酶:

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2\,H_2O + NAD^+$$

(c) 超氧化物歧化酶:

$$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

(d) 超氧化物歧化酶/过氧化氢酶:

$$4\,O_2^- + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O + 3\,O_2$$

(e) 超氧化物还原酶:

$$O_2^- + 2\,H^+ + \text{cyt } c_{reduced} \rightarrow H_2O_2 + \text{cyt } c_{oxidized}$$

图 6.28 对毒性氧起作用的酶。(a) 过氧化氢酶和 (b) 中的过氧化物酶一般都是含卟啉的蛋白质，虽然在这种情况下一些核黄素蛋白也可以起作用。(c) 超氧化物歧化酶是一种含金属的蛋白质，金属是 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+} 和 Fe^{2+}。(d) 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的联合反应。(e) 超氧化物还原酶以还原型的细胞色素 c 为电子供体催化 O_2^- 还原为过氧化氢。

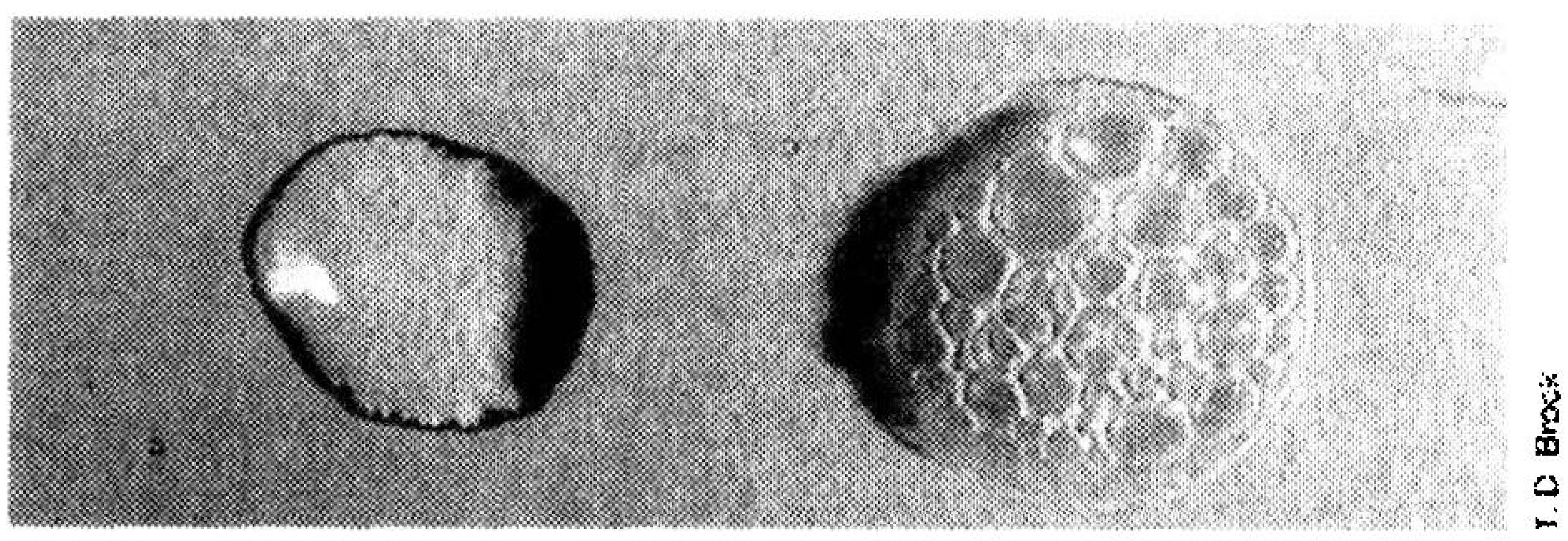


图 6.29 检测微生物培养液中过氧化氢酶存在的方法。从琼脂培养液中挑一环细胞与载片上一滴 30%H_2O_2混合。若立即出现气泡就说明有过氧化氢酶存在。产生的气泡是 O_2，即通过下面的反应所得：$H_2O_2+H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$。

处理超氧化物的其他方式存在于某些专性厌氧原核生物中。例如，强烈炽热球菌激烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）不存在超氧化物歧化酶而是另外一种特殊的酶——超氧化物还原酶，它负责超氧化物的去除。与超氧化物歧化酶不同，超氧化物还原酶将超氧化物还原为过氧化氢不产生氧气（图 6.28e），因此避免了将有机体暴露在氧气之下。*P. furiosus* 也缺少过氧化氢酶，这种酶与超氧化物歧化酶类似也能产生氧气（图 6.28a）。在 *P. furiosus* 中，由过氧化物还原酶产生的过氧化氢是通过与过氧化物类似的酶消除的，以水作为最终的产物（图 6.28b）。

过氧化物还原酶可能广泛分布在专性厌氧菌中，基因组学研究已经表明在一些兼性厌氧菌中存在着过氧化物还原酶类似的基因。这就意味着这些有机体确实有一些机制来处理高毒性的超氧化物，以前人们只是因为它们缺少超氧化物歧化酶而认定为严格的厌氧菌。培养基中这些有机体对氧气的敏感性则可能完全是因为其他的到目前为止还未知的原因。

有趣的是，许多专性厌氧的超嗜热菌都非常能够忍受寒冷和有毒环境。尽管在这些条件下它们不会生长，但是超氧化物还原酶可能起到了防止被这些因素杀死的作用。在这些微生物从一个深海高温系统中转移到另外一个系统的过程中，对氧气的忍受程度起到很重要的作用（见 19.8 节）。

概念检查

细胞中可能会形成一定形式的毒性氧，但是有机体中存在的酶能中和其中的大多数有毒物质。尤其是过氧化物似乎被认为是一种常见的毒性氧形式。

◆ 过氧化物歧化酶如何保护细胞免受毒性氧的伤害？

◆ 过氧化物歧化酶的活性与过氧化物还原酶的活性有何区别？

复习题

1. 描述细胞生长和分裂过程中的主要分子过程。哪些蛋白质辅助细胞分裂过程？（见 6.1 节）
2. 描述 Fts 蛋白在细胞分裂过程中的作用。（见 6.2 节）
3. 显微镜下如何区分携带有 MreB 蛋白突变的菌株与野生型菌株？原因何在？（见 6.2 节）
4. 青霉素如何杀死细菌？（见 6.3 节）
5. 有机体的特定生长速率（k）与世代时间 g 之间的差异？（见 6.4 节和 6.5 节）
6. 从第一次接种到新鲜培养基中开始描述一下细菌群体的生长周期？（见 6.6 节）
7. 描述一种直接和间接的测量微生物生长的方法。要确信你所选用的方法与你的定义相符？（见 6.7 节和 6.8 节）
8. 简单描述单个细胞在平板上分裂形成可见菌落的过程。以此解释为背景，描述活菌计数的原理。（见 6.7 节）
9. 恒化器如何调整细胞的生长速率和细胞数目？（见 6.9 节）
10. 仔细观察描述生长速率和温度关系的图 6.17。从生物化学角度解释为何某种生物的最适生长温度经常接近于它的最高温度而不是最低温度？（见 6.10 节）
11. 你在哪些地方会发现嗜冷菌和超嗜热菌？（见 6.11 节和 6.12 节）
12. 关注环境的 pH 和细胞 pH，如何区分嗜酸菌和嗜碱性菌？它们在哪些方面相似？（见 6.13 节）
13. 用分子术语解释一下嗜盐菌的细胞如何使水流入到细胞中？（见 6.14 节）
14. 列出 3 种类型微生物产生的相容性溶质。列出至少 2 个它们之间的共同之处。（见 6.14）
15. 从对氧气的敏感性和在氧气存在情况下的生长能力方面对比耐氧厌氧菌和专性厌氧菌。耐氧厌氧菌与微好菌的区别点何在？（见 6.15 节）
16. 从以下几方面对比过氧化氢酶、过氧化物歧化酶和过氧化物还原酶：底物、氧化产物、含有这些酶的菌株及在细胞中所起的对氧气的忍受作用。（见 6.16 节）

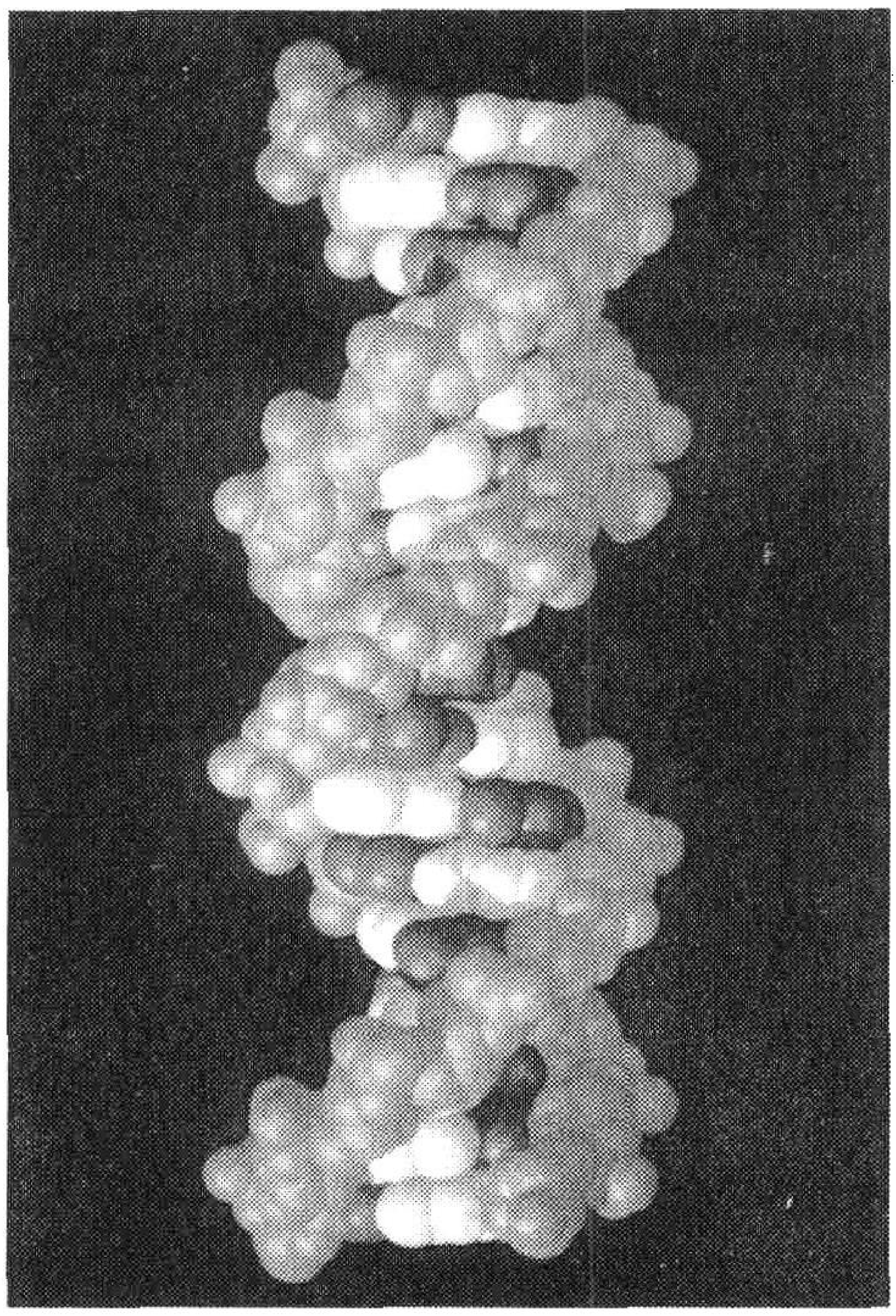
应用题

1. 假定在起始 1ml 富集培养基中只有 4 个细菌细胞，1h 的停滞期，世代时间为 20min。在 1h 后，1L 培养液中有多少个细胞？2h 后呢？如果起始 4 个细胞有一个死去了，2h 后又会有多少细胞呢？
2. 计算下面生长实验的世代时间：起始接入 *E. coli* 为 5×10^6个/ml，1h 的停滞期，对数生长 5h 后，群体细胞数达 5.4×10^9个/ml？
3. 返回第 3 章，找到一幅图，这幅图能非常详细地描述当培养基温度升到 80℃时，嗜温菌（如 *E. coli*）会有什么情况出现。把此图与第 6 章中详细描述将延胡索酸火叶菌（*Pyrolobus fumarri*）细胞置于与上面相同的环境条件下出现的情况图比较一下，试描述为什么没有一种微生物能够生长？
4. 你预计在温泉中会发现嗜冷菌吗？为什么？有可能从冷水环境中分离到超嗜热菌吗？解释原因。

（魏东盛 译，徐海津 校）

7

分子生物学导论



虽然在自然界中，存在的核酸种类很多，但是所有细胞含有双链 DNA 基因组。在细胞中基因组指导所有分子的活动。

词汇表

氨酰-tRNA 合成酶（aminoacyl-tRNA synthetase）：一组酶，每一种酶能催化一种正确的氨基酸与 tRNA 连接

反密码子（anticodon）：在 tRNA 分子中的 3 个碱基序列，它在蛋白质合成中与密码子碱基配对

反向平行（antiparallel）：在双链 DNA 中，一条链方向为 $5'\rightarrow3'$，另一条链方向为 $3'\rightarrow5'$

染色体（chromosome）：遗传物质，在原核生物中通常以环形存在，在真核生物中是线形，它携带有决定细胞功能的基因

密码子（codon）：位于 mRNA 中的 3 个碱基序列，编码一种氨基酸

互补（complementary）：核酸序列之间碱基能够互相配对

DNA 促旋酶（DNA gyrase）：主要存在于原核生物中的一种酶，在 DNA 中引入负超螺旋

DNA 聚合酶（DNA polymerase）：以反向平行的 DNA 链为模板，按照 $5'\rightarrow3'$ 方向催化合成新链 DNA

外显子（exon）：在一个断裂基因中，具有编码功能的 DNA 序列（与内含子对应）

基因（gene）：一段 DNA，它对应一种蛋白质（通过 mRNA）、一个 tRNA 或一种 rRNA

基因组（genome）：一个细胞或一个病毒中的一整套基因

杂交（hybridization）：不同来源的单链核酸通过碱基配对互补形成双链核酸分子

内含子（intron）：在一个断裂基因中间插入的非编码 DNA 序列（与外显子对应）

信使 RNA（messenger RNA，mRNA）：含有编码特定蛋白质所必需的遗传信息的 RNA 分子

分子伴侣（molecular chaperone）：能帮助其他蛋白质折叠或使部分变性的蛋白质重新折叠的一类蛋白质

操纵子（operon）：由一个操纵基因控制表达的一簇基因

聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）：利用特异性引物和 DNA 聚合酶通过重复循环，在体外扩增特异 DNA 序列的一种方法

初始转录物（primary transcript）：转录直接产生未经加工的 RNA 分子

引物（primer）：一段寡聚核苷酸分子，在 DNA 复制中，DNA 聚合酶在其上结合第一个脱氧核苷酸

启动子（promoter）：DNA 上的一个位点，RNA 聚合酶结合在此位置上并开始转录

复制（replication）：以 DNA 为模板进行的 DNA 合成

限制酶（restriction enzyme）：在 DNA 分子上能够识别特定的碱基序列并切开双链 DNA 的一种酶

核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）：存在于核糖体中的一类 RNA，参与蛋白质合成过程

核糖体（ribosome）：由 rRNA 和蛋白组成的细胞质颗粒，是蛋白质合成的加工厂

RNA 聚合酶（RNA polymerase）：以反平行 DNA 链为模板，利用碱基配对互补沿 $5'\rightarrow3'$ 方向催化 RNA 合成的一种酶

半保留复制（semiconservative replication）：DNA 合成产生新的双螺旋结构产物的过程，产物中一条链为亲本链，另一条链为子代链

转录（transcription）：以 DNA 为模板，合成 RNA

转运 RNA（transfer RNA，tRNA）：在翻译过程中作为衔接分子，它既对特定的氨基酸有专一性，又对一种或一种以上的密码子有特异性

翻译（translation）：以 mRNA 的遗传信息为模板合成蛋白质

在第 1 章中，我们将细胞称为化学机器和编码设备。作为化学机器，细胞能积累数量巨大的大分子并将它们转移到新的细胞中。作为编码设备，对细胞的遗传信息能够进行储存、操作和利用。基因和基因操作是分子生物学的主题，也是本章讨论的重点。我们将在此研究基因、DNA/RNA 的结构和功能及 DNA 的复制。然后讨论蛋白质合成，这些大分子在细胞的结构和功能方面起重要作用。

I 基因和基因表达

7.1 大分子和遗传信息

遗传信息的功能单位就是基因（gene）。所有微生物，确切地说是所有生物，都含有基因。因此对什么是基因及它的功能的基本认识，对于了解细胞和病毒的结构、功能及行为非常重要。然而，由于生物学快速地向以细胞基因组定义一种细胞的方向发展（基因组时代），如果我们研究微生物的生物学，就必须清楚生物信息的传递过程。

基因和信息传递的步骤

在所有细胞中，基因由脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）组成。基因信息以 DNA 中的碱基——嘌呤（腺嘌呤和鸟嘌呤）和嘧啶（胸腺嘧啶和胞嘧啶）的排列序列形式存在。DNA 中的信息转移给核糖核酸（ribonucleic acid，RNA），RNA 或者作为信息的中间体（信使），或者在一些情况下作为细胞机器的更活跃的部分。因为 DNA、RNA、蛋白质这三类分子在它们的序列中都含有遗传信息，所以常称它们为信息大分子（informational macromolecule）（见 3. 2 节）。

遗传信息流动的分子过程分为 3 个阶段（图 7. 1）。

（1）复制：作为细胞遗传物质的 DNA 分子由两条长链组成双螺旋（double helix）结构（见 3. 5 节）。在复制过程中，DNA 加倍的产物是两个双螺旋分子（图 7. 1）。

（2）转录：DNA 参与蛋白质合成，通过中间体 RNA 起作用。遗传信息传送给 RNA 称为转录（transcription）。能够编码一种或多种多肽链的 RNA 分子称为信使 RNA（messenger RNA，mRNA）。一些基因含有其他类型 RNA 的遗传信息，如转运 RNA（transfer RNA，tRNA）和核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）。这些 RNA 在蛋白质合成中起作用，但它们本身并不含有蛋白质合成所需的编码信息。

（3）翻译：在 mRNA 中通过特定的碱基序列决定多肽链中氨基酸的序列。基因的碱基序列和多肽链的氨基酸序列之间有直接线性对应关系（图 7. 1）。mRNA 中的 3 个碱基编码一种氨基酸，每一个碱基三联体称为一个密码子（codon）。遗传密码（genetic code）通过蛋白质合成系统翻译成蛋白质。蛋白质合成系统是由核糖体（ribosome）（由蛋白质和 rRNA 构成）、转运 RNA 和一系列酶组成。

图 7. 1 中所示的 3 个信息传递步骤所有细胞都采用。在第 9 章中，我们将了解一些病毒，这些病毒不遵守分子生物学的中心法则（central dogma of molecular biology，DNA→RNA→蛋白质）。有些病毒中的遗传物质是 RNA，这些 RNA 可直接作为 mRNA发挥功能。还有一种反转录病毒，如 HIV（AIDS 的病原体），它的 RNA 基因

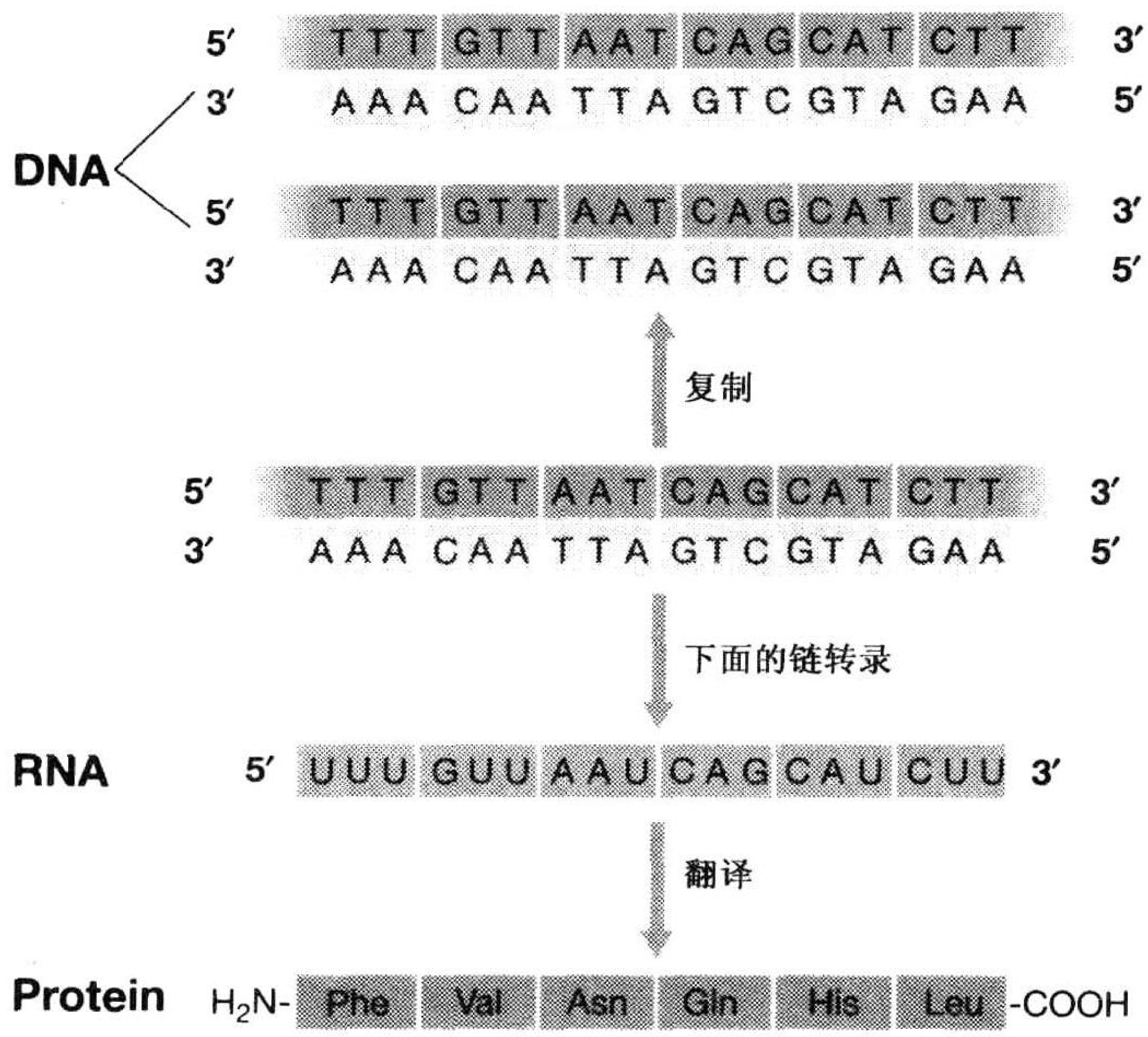


图 7.1 三种类型的信息大分子的合成。在任何部位，DNA 双螺旋的两条链中只有一条链被转录。

组复制产物是 DNA（反转录)。注意在这两种情况下，遗传信息传递方式虽说是从核酸到核酸，但是并没有按中心法则的方式进行。RNA 病毒只是病毒世界告诉我们的许多分子水平的特殊事例之一。

原核和真核基因组

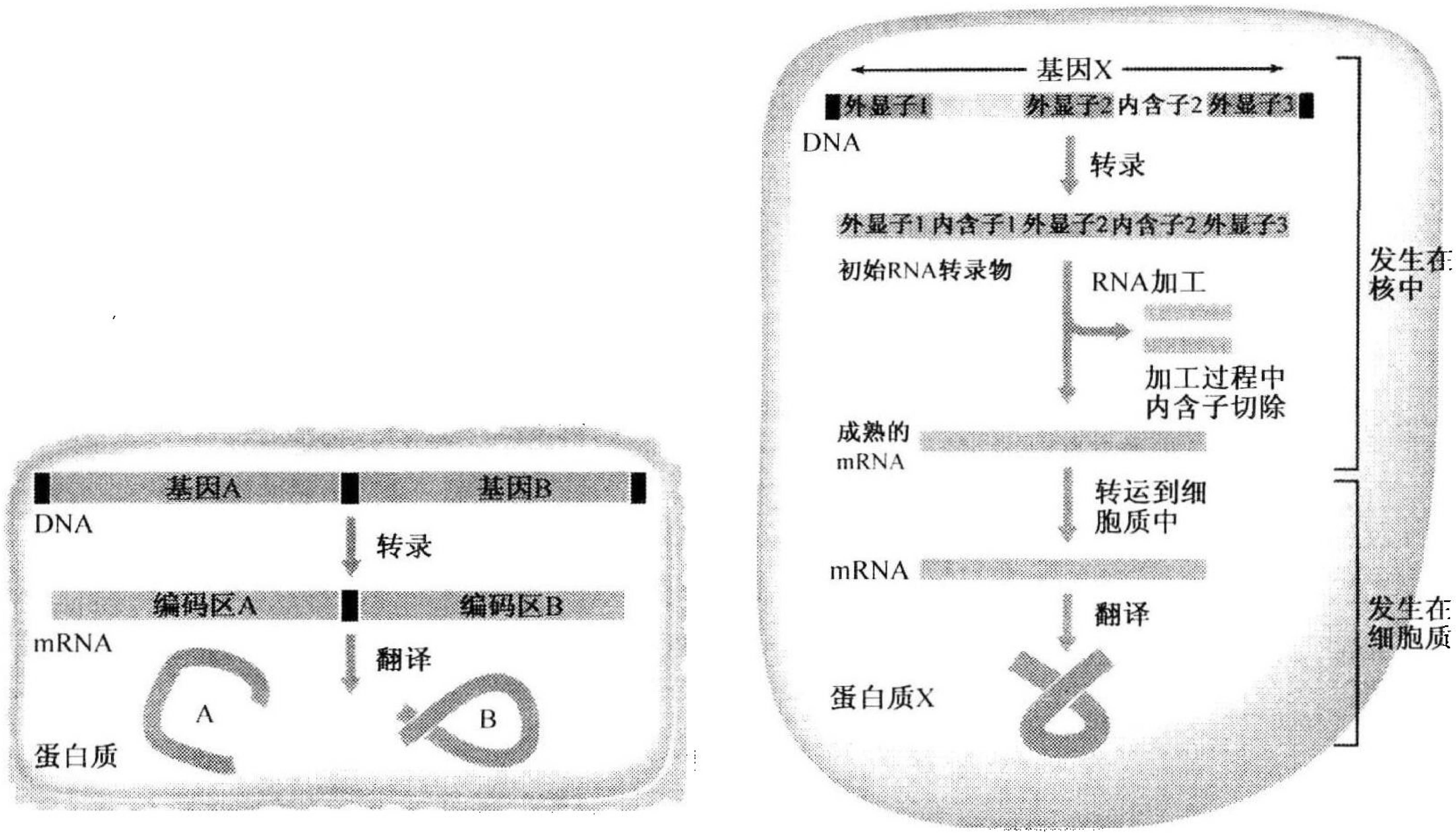
复制、转录、翻译在所有生物中发生。然而，这几个过程的机制在原核生物和真核生物中有些不同。这种区别一部分应归于 DNA 结构的不同和真核生物具有的细胞核。

在第 2 章中我们已经强调过原核生物和真核生物中 DNA 结构的基本区别，即典型的原核基因组是由一个共价闭合环状的 DNA 分子组成，它分布在细胞的胞质中，而真核生物的基因组由多条线性 DNA 以独特的染色体形式存在于细胞核中。

事实上在所有原核生物中都没有使染色体与细胞质分开的膜（见 2.2 节)。然而，在真核细胞中，染色体位于核内，核糖体在细胞质中，所以转录和翻译在空间上是分开的。

在第 2 章中我们也强调过两种类型的原核生物——细菌和古生菌在系统发育上的不同。这两种生物的分子生物学许多方面差异很明显。在很多情况下，古生菌和真核生物间的分子过程比细菌和古生菌之间更加相似。

在所有细胞中，基因的定义是相同的。一段 DNA 指导合成一种蛋白质（通过 mRNA)、一种 tRNA 或 rRNA。真核生物蛋白质编码基因常常是分成两个或多个编码区域，非编码区分隔编码区。编码序列称为外显子（exon)，插入的非编码区域称为内含子（intron)。外显子和内含子都被转录成初始转录物（primary transcript）. 去除非编码区后产生有功能的 mRNA，它将被转运到细胞质用于翻译（见 14.8 节)。有少数原核生物的基因也含有内含子，但绝大多数没有。图 7.2 中简要对比了原核和真核生物中遗传信息的传递过程。



(a) 原核生物　　(b) 真核生物

图 7.2 原核和真核生物中信息传递的对比。（a）原核生物，一个 mRNA 常常含有一个以上的编码区。（b）真核生物，非编码区（内含子）在翻译之前从初始 RNA 转录物中除去，剩下的外显子进一步形成成熟的 mRNA，真核生物 RNA 加工细节见 14.8 节。

概念检查

大分子合成的 3 个关键过程是：①DNA 的复制；②转录（以 DNA 为模板合成 RNA）；③翻译（是以 mRNA 为模板合成蛋白质）。虽然在原核生物和真核生物中基本过程相同，但是真核生物中遗传信息的组成方式更加复杂，因为真核生物的许多基因分为编码区（外显子）和非编码区（内含子）。

◆ 遗传信息传递过程的 3 种信息大分子是什么？

◆ 在所有细胞中遗传信息传递的 3 个过程是什么？

Ⅱ DNA 结构

在第 3 章中我们论述了核酸的一般结构。在本章下边的几节里我们将讨论 DNA 的详细结构，包括在细胞中发现的含有 DNA 的遗传类型。以这些信息作为基础，我们将讨论 DNA 如何复制、如何转录 RNA 和翻译成蛋白质。

7.2 DNA 结构：双螺旋

我们发现在 DNA 中有 4 种核酸碱基：腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）。如图 3.11 中给出的那样，DNA 链的骨架是由磷酸和脱氧核糖为单位

交替构成的；每一个糖连接一个核酸碱基。磷酸连接两个糖，即磷酸将一个糖的 3′-碳原子与下一个相邻的糖的 5′-碳原子连接起来（图 7.4）。DNA 分子的一端糖的 5′-羟基上有一个磷酸，而在另一端糖的 3′-位上有一个自由羟基。

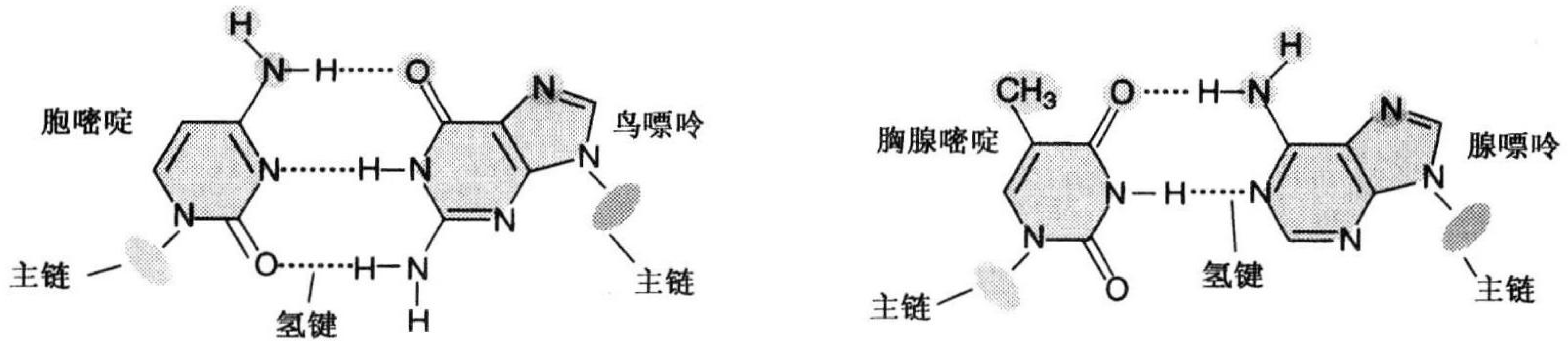


图 7.3 腺嘌呤（A）与胸腺嘧啶（T），鸟嘌呤（G）与胞嘧啶（C）通过氢键配对。这两对碱基在双链 DNA 中是两个典型的碱基对。在双螺旋的大沟里的原子，参与蛋白质相互作用的用粉色标出。双链 DNA 的脱氧核糖磷酸主链如图所示。注意双链 DNA 绿色的不同阴暗度在本书中代表相同意义。

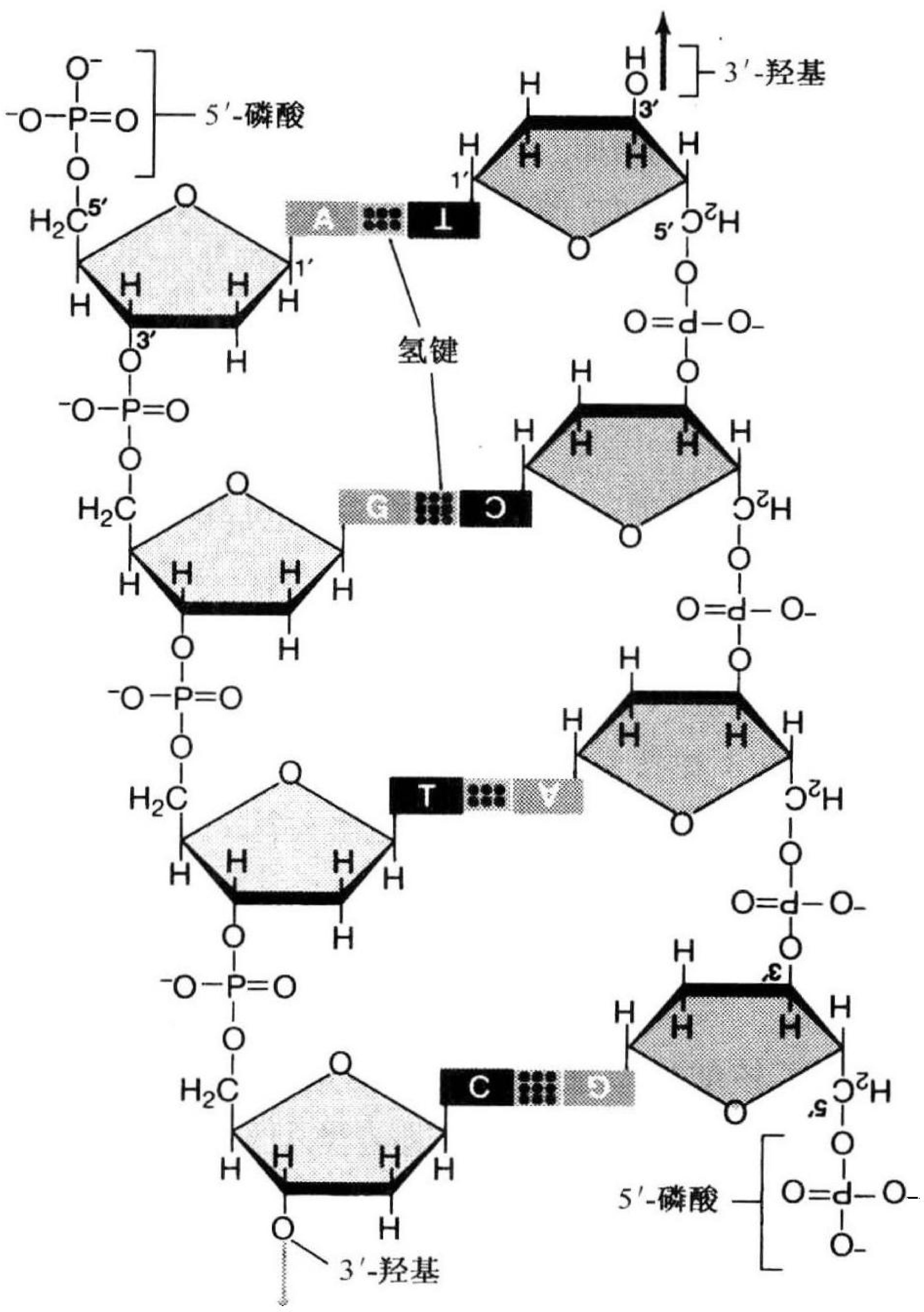


图 7.4 DNA 结构。DNA 的互补和反向平行特征。注意一条链的末端是 5′-磷酸，而另一条链的末端是 3′-羟基。红色碱基代表嘧啶，即胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）；黄色碱基代表嘌呤，即腺嘌呤（A）和鸟嘌呤（G）。

双螺旋 DNA

在第 9 章中我们将知道一些病毒的染色体是单链的。但是在所有细胞中，染色体并不是以单链多聚核苷酸形式存在的，而是以两条多聚核苷酸链的形式存在，并且两条链的碱基序列是互补（complementary）配对的。DNA 双链互补是由于嘧啶和嘌呤碱基专一性配对引起的：腺嘌呤总是与胸腺嘧啶配对，鸟嘌呤总是与胞嘧啶配对（图 7.3）。两条链以反向平行方式排列成双螺旋（图 7.3 和图 7.4）。例如，图 7.4 中左边的链由 5′→3′（从上到下）的顺序排列，而另一条链由 5′→3′（从下到上）排列。

然而在 DNA 分子中两条链是互相围绕弯曲成螺旋状形成双螺旋（图 7.5）。在双螺旋中，DNA 形成两个明显的沟，大沟和小沟。有许多特异性与 DNA 相互作用的蛋白质（在第 8 章中我们将会看到）与 DNA 的大沟相互作用，因为大沟在空间上能够容纳这些蛋白质。由于双螺旋具有规律性，碱基的一些原子总是暴露在大沟中（有些也在小沟中）。核酸上的关键区域在蛋白质与 DNA 相互作用中起重要作用（图 7.3）。

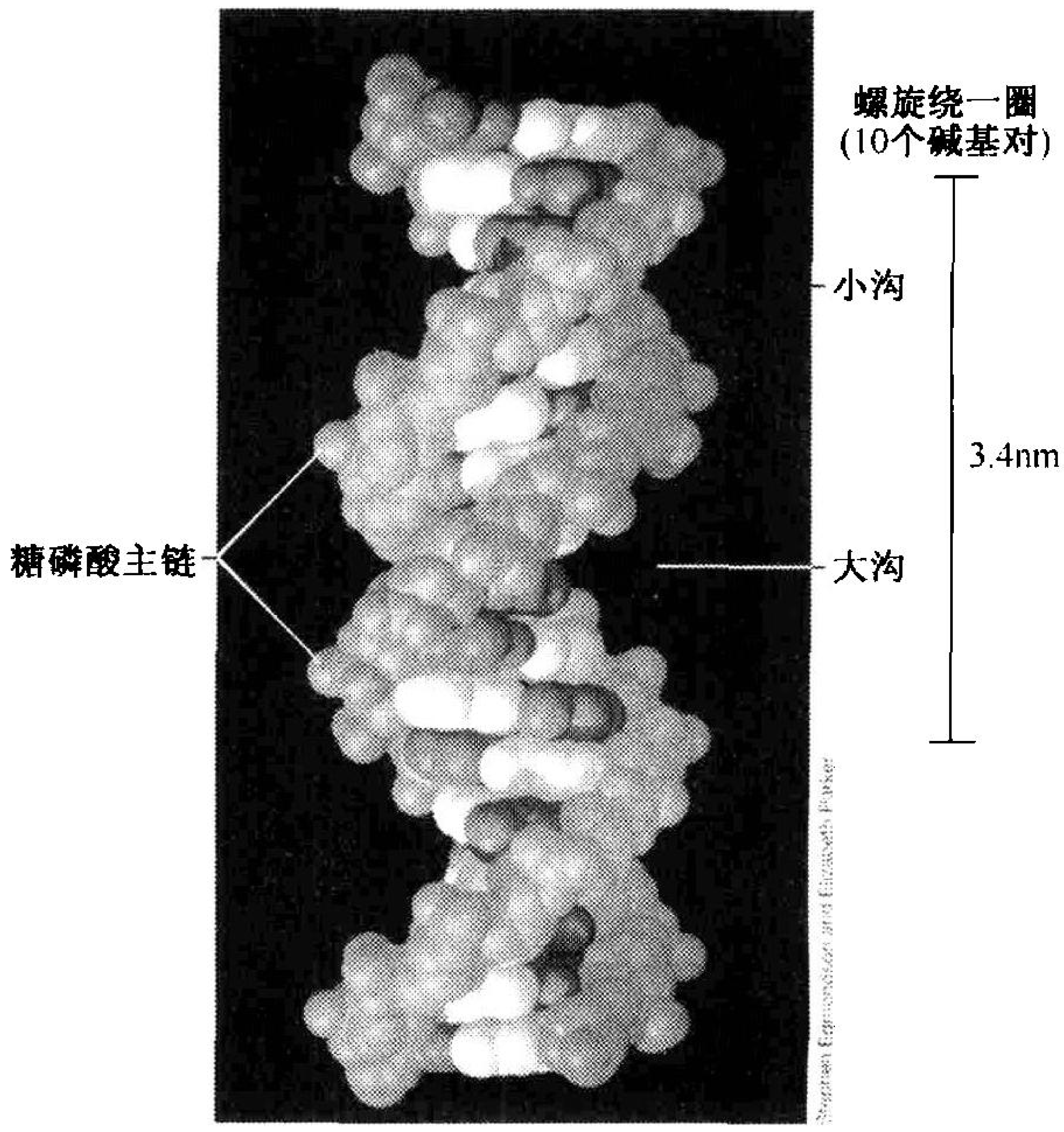


图 7.5 由计算机制作的一小段 DNA 模型，显示出双螺旋的结构排列。一条糖磷酸主链以蓝色表示，另一条用绿色表示。嘧啶碱基用红色代表，嘌呤用黄色代表。注意大沟和小沟位置。一个螺旋圈含有 10 个碱基对。

DNA 分子的大小

DNA 分子的大小可用核苷酸中碱基或碱基对的数目来表示，因此，含有 1000 个碱基的 DNA 分子是 1kb（kilo base）DNA。如果 DNA 是双螺旋，那么就是 1000 个碱基对（kb）。因此，双链螺旋是 5000 个碱基长度，它就有 5000 个碱基对，DNA 分子的大小是 5kb。大肠杆菌（*Escherichia coli*）染色体 DNA 有 4640kb。由于目前我们利用的基因信息数量巨大，我们通常说百万碱基对或兆碱基对（Mb），如大肠杆菌(*E. coli*)的

基因组是 4.64Mb。

根据每个碱基对的实际长度在螺旋长度中占 0.34 纳米（nm），螺旋绕一圈含有 10 个碱基对，因此，1000 个碱基对的 DNA 有 100 个螺旋圈，长度是 0.34μm。我们不久将会看到这种计算很有意思（见 7.3 节）。

反向重复、二级结构和茎-环

长的 DNA 分子易弯曲，但是，小于 100bp 的 DNA 其结构比较钢硬不易弯曲。一些短的 DNA 片段通过蛋白质与其相互作用能够产生弯曲。然而某些序列自身在 DNA 中就能发生弯曲。这种弯曲 DNA 序列常常涉及 5～6 个连续排列的腺嘌呤（在同一链之中），每一个序列之间由 4～5 个碱基分开，另外，当某些蛋白质与 DNA 相互作用时，一些序列能够引起 DNA 弯曲。DNA 的弯曲是基因表达调控的一种机制（基因的开启和关闭），这一点我们将在第 8 章讨论。

在 DNA 分子中经常存在短的重复序列。有许多蛋白质与含有相反方向重复序列的 DNA 区域相互作用（第 8 章），这种重复类型称为反向重复（inverted repeat）。反向重复序列使 DNA 序列出现二重对称结构（图 7.6）。相邻的反向重复序列在理论上能使 DNA 形成茎-环结构。这里是通过正常的碱基配对和反平行链形成短双链螺旋区域。

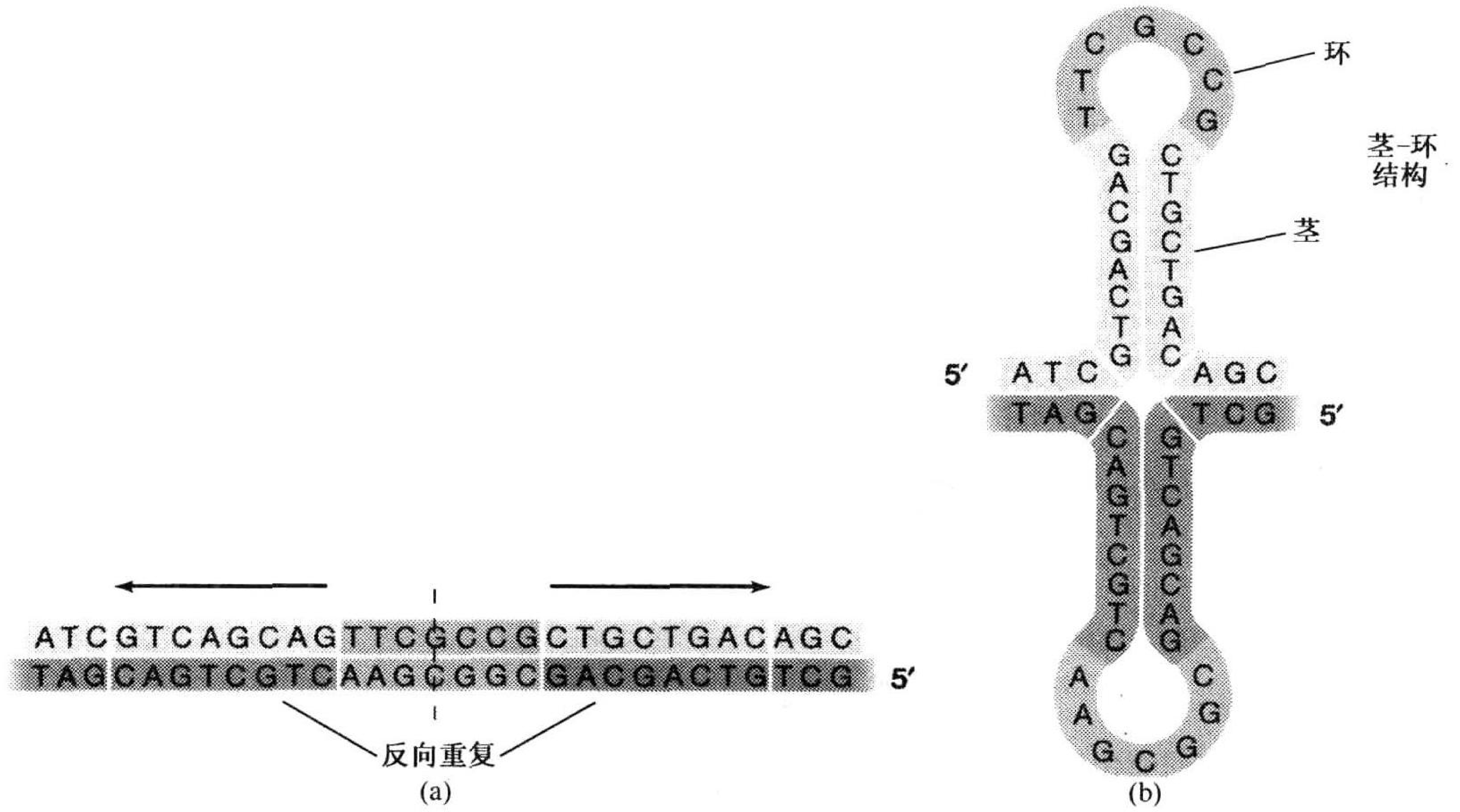


图 7.6 反向重复和茎-环结构形成。(a) 在 DNA 分子中邻近的反向重复序列，箭头指示围绕对称轴（破折线）的对称序列。(b) 在同一链中，通过碱基配对和互补形成茎-环结构。注意由这一 DNA 的任意一条链转录的 RNA 只能形成一个茎-环结构。

在细胞内，DNA 中的茎-环结构可能并不广泛存在，然而在 RNA 中，随着从 DNA 转录成 RNA 的过程产生茎-环结构是普遍的。单链核酸通过碱基配对形成的二级结构（见 3.5 节）对于 tRNA（见 7.15 节）和 rRNA 的功能是关键性的（见 11.5 节）。此外，即使 DNA 中不形成茎-环结构，DNA 中的反向重复序列经常是 DNA 专一性结合蛋白的结合位点，这些结合蛋白通常作为转录调节因子（第 8 章）。

温度对 DNA 结构的影响

虽然碱基对之间的单个氢键是很弱的（见 3.1 节），但在一个长的 DNA 分子中能将两条链有效地固定在一起，是因为在一个 DNA 分子中存在着数百万或上亿的氢键，这取决于 DNA 中碱基对数量。回顾图 7.3，每个 A∶T 碱基对有 2 个氢键，每个 C∶G 碱基对有 3 个氢键，因此 GC 对比 AT 对中的氢键强。

从细胞中分离 DNA 的时候，在室温条件下，生理盐浓度中，DNA 保留着双螺旋的形式。然而，假如温度升高，氢键被破坏，而维持双链的共价键就不能结合在一起而会断开，所以 DNA 的两链将被分开。这个过程称为变性（denaturation）或熔解（melting），而且通过实验能检测到，因为单链和双链核酸在紫外线 260nm 处吸收能力不同（图 7.7）。

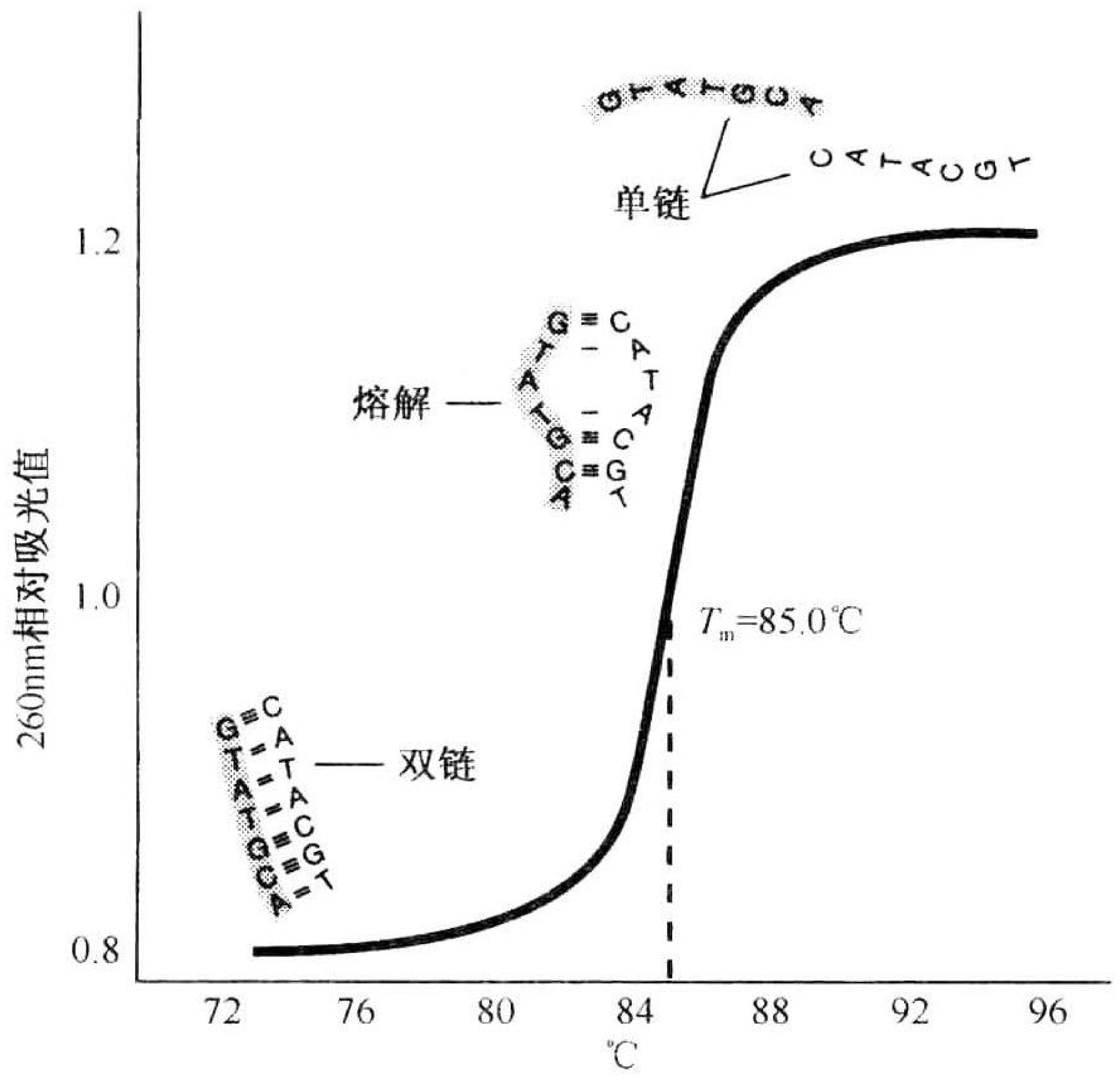


图 7.7　DNA 的热变性。由于双螺旋变性后的 DNA 在紫外线 260nm 处吸收值增加。这个转变是相当剧烈的，中点的温度 T_m 与 DNA 的 GC 含量呈正比。虽然变性的 DNA 通过慢慢的冷却能够复性，但是这个过程的曲线与本图并不相似，在温度低于 T_m 时，复性更加彻底，但需要相当长的孵育时间。

同样大小的 DNA 中 GC 对的百分率比 AT 对高时，那么变性温度就比较高。如果加热的 DNA 慢慢冷却，这个过程称为退火（annealing），有活性的双链 DNA 能再次形成。这个过程不仅能使有活性的双链 DNA 恢复，而且还能使两个不同来源的单链形成杂交分子。杂交（hybridization），是指人为地将两个单链的核酸通过碱基对互补形成双链结构。这在分子生物学中是一种强有力和有用的技术（见 7.7 节）。

概念检查

DNA 是双链分子形成的螺旋，以碱基对的数量来衡量分子大小。双螺旋的两链是反平行的，而反向重复使其能够形成二级结构。双螺旋 DNA 分子通过加热能变性，随着冷却能恢复原状。

◆ 解释双链 DNA 的结构中反向平行一词的意思。
◆ 解释双链 DNA 互补。
◆ 解释在核酸中变性、退火和杂交的意思。

7.3 DNA 结构：超螺旋

一个松弛的 DNA 分子，通过已知的碱基对的数量能够准确地计算出螺旋圈数（图 7.8）。然而，线性化的大肠杆菌染色体，它的长度大于 1mm，大约是它大肠杆菌细胞本身的 400 倍。如此大的 DNA 是如何包裹到这么小的空间中呢？这个问题解决的办法就是使 DNA 的结构呈现一种“更高的顺序”，在这种顺序中，双链 DNA 在一个称为超螺旋（supercoiling）的过程中进一步缠绕。

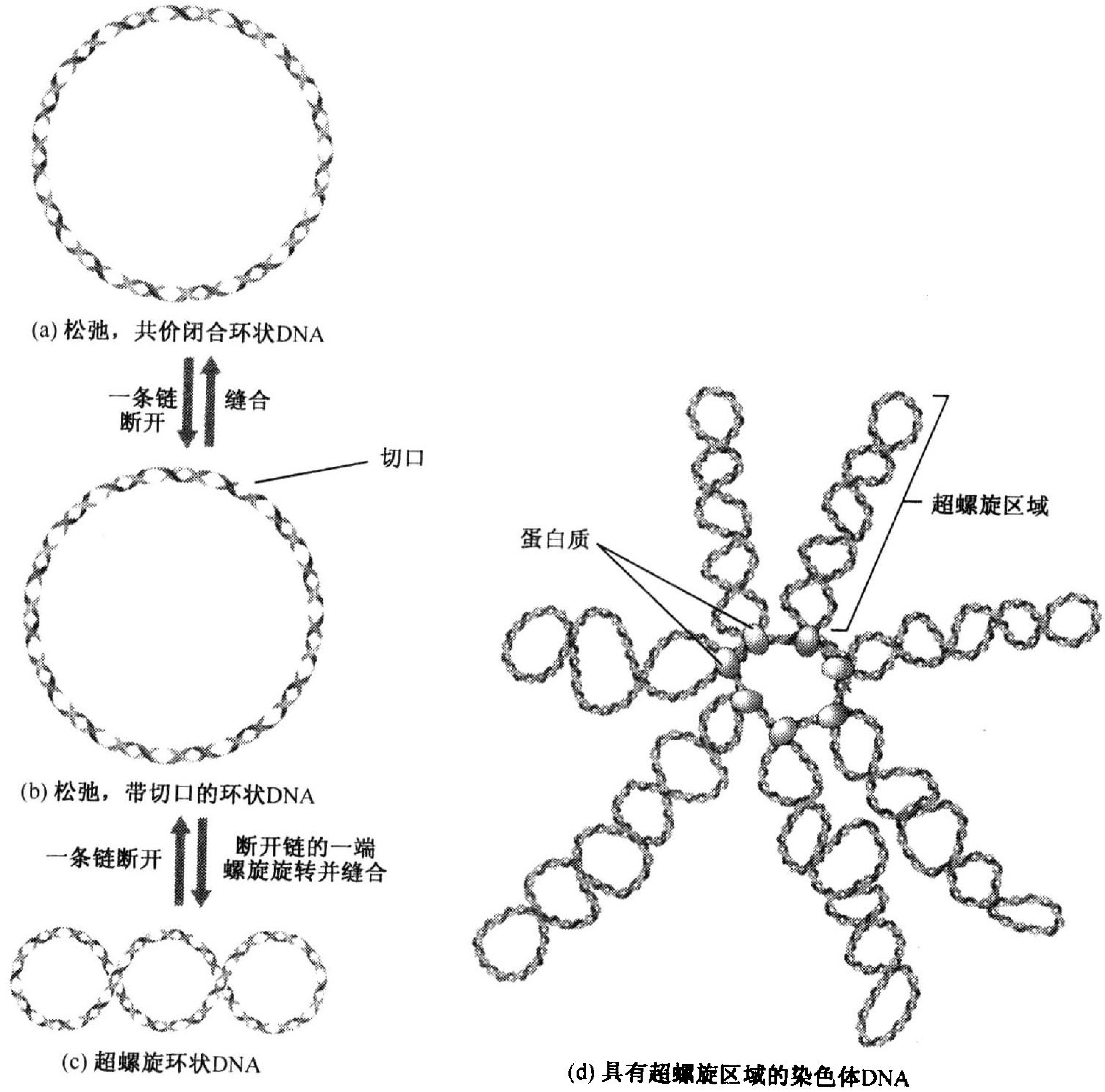


图 7.8 超螺旋 DNA。(a)、(b)、(c) 显示超螺旋环状 DNA 和松弛的、有切口的环状 DNA 的相互转换。切口就是一条链的磷酸二酯键打开。(d) 实际上，细菌染色体的双链 DNA 不是以一个超螺旋形式排列，而是以几个超螺旋的区域存在，正如上图所示。在大肠杆菌当中，有 50 多个超螺旋区域存在，每一个区域通过结合特异性的蛋白质而稳定的存在。

在图7.8中，图解了一个环状的DNA双链是如何发生超螺旋过程的。超螺旋将DNA分子扭曲，类似橡胶带受力后的扭曲。DNA可以被正向或负向超螺旋化。负超螺旋（negative supercoiling）是当DNA以右手螺旋的反方向缠绕时形成的双链螺旋。天然的DNA主要以负超螺旋形式存在，很有意思的是它在古生菌中除外（后续）。

尽管有一些蛋白质是结合在原核生物的染色体上，但是与真核生物的染色体相比，原核生物的染色体可以认为是裸露的DNA。在真核生物中，大量蛋白质以一种普遍的方式结合到DNA上。就像前面提到的那样（见7.1节），每一个真核细胞的染色体都含有一个线性双链DNA分子，这种线性DNA分子与一种称为组蛋白（histone）的蛋白质相缠绕，形成的结构被称为核小体（nucleosome）（图7.9）。在真核生物的染色体中，核小体的形成在DNA中引进了负超螺旋。

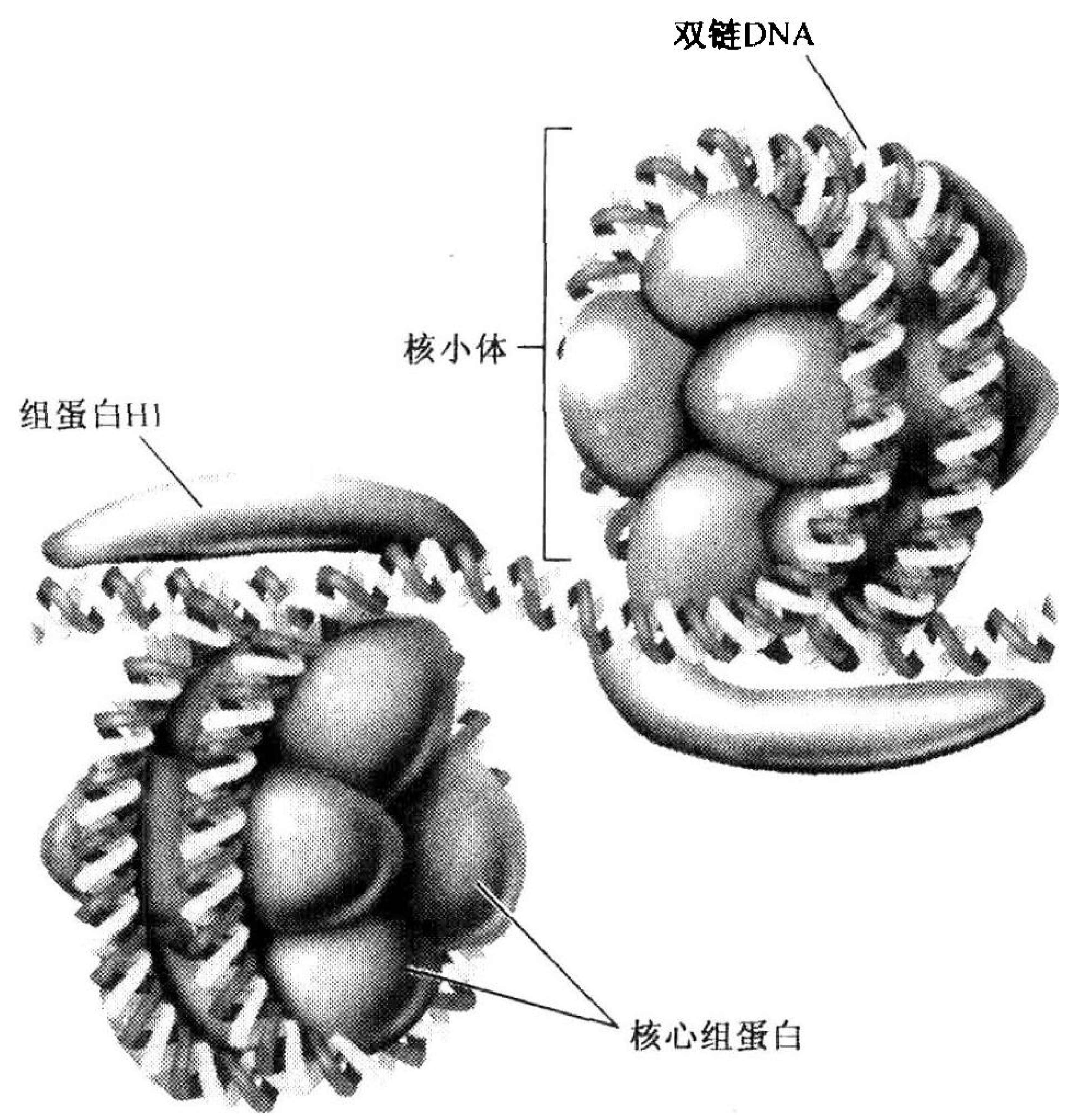


图7.9　围绕组蛋白核心包装DNA形成核小体。 核小体沿着DNA链分布，形成一个串珠状结构。这种排列在真核细胞中是DNA的典型分布。在真核生物中，“核心”组蛋白是由8个蛋白质组成，H2A、H2B、H3、H4分别有2个拷贝，H1组蛋白是1个拷贝。一个核小体含有200个碱基对。

组蛋白是一种带正电荷的蛋白质，它能够中和带负电荷的DNA（来自于磷酸基团）。核小体是以很规则的间隔沿着双螺旋分布的，但是它们能够聚合在一起形成一个称为染色质（chromatin）的纤维状物质。染色质本身能够被折叠和环化进一步压缩，最终形成一个被称为染色体的非常致密的结构。这就是在真核细胞的细胞分裂过程中非常容易可见的染色体（chromosome）（见14.7节）。

拓扑异构酶：DNA促旋酶

在细菌中和大多数的古生菌中，存在着一种酶，称为DNA促旋酶（gyrase）。这种酶在DNA中引入负超螺旋。这个过程是通过几个步骤来完成的。首先，环状的DNA

分子被扭曲；然后，其中一条链在两链相交的地方发生断裂，在完整链的另一侧重新连接（图 7.10）。DNA 促旋酶是被称为拓扑异构酶的一种类型，特指拓扑异构酶Ⅱ。对于一些影响细菌的抗生素，如喹啉类（萘啶酮酸）、氟代喹啉类（ciprofloxacin）和新生霉素，它们能够抑制 DNA 促旋酶的活性。新生霉素对几种古生菌的 DNA 促旋酶也有抑制作用。

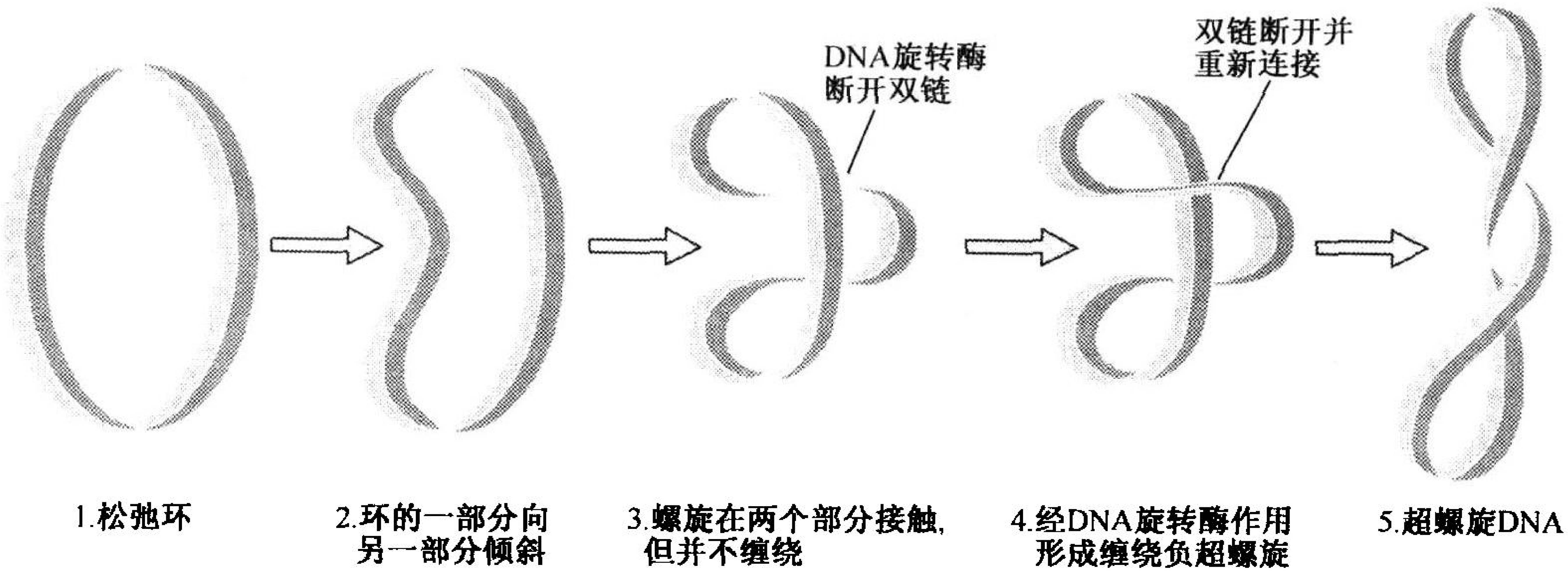


图 7.10 DNA 促旋酶。环状 DNA 分子通过 DNA 促旋酶作用，使双链断开，DNA 促旋酶在 DNA 中引入负超螺旋。

另一些酶能够解开 DNA 超螺旋，这种酶称为拓扑异构酶Ⅰ（topoisomerase Ⅰ），在 DNA 中使一条链断开，使一条链围绕另一条链旋转。正如图 7.8 所示，在主链中的任何一条链断开（切口）都使 DNA 进入松弛状态。每次阻止完整的细菌染色体 DNA 变松弛，就形成一个切口（图 7.8），染色体含有超螺旋区域。在其中一个区域中 DNA 的切口不松弛其他区域里的 DNA。是什么使处于这个区域的 DNA 保持超螺旋还不清楚，但是很有可能涉及特殊蛋白质。

通过拓扑异构酶的活性，DNA 分子能够交替地进行超螺旋和松弛。因为超螺旋对 DNA 包装到细胞中是必需的，而松弛对于 DNA 复制是必需的。这两个互补的过程在细胞生物学当中起了非常重要的作用。在大部分原核生物中，负超螺旋的程度是 DNA 促旋酶和拓扑异构酶Ⅰ之间酶活性保持平衡的结果。除了复制之外，超螺旋能够影响基因表达。虽然一般来说，基因的转录速度受到超螺旋的抑制，但是一些基因却相反，当它们的 DNA 呈现超螺旋状态时，转录活性反而更高。

古生菌和逆旋转酶

有少数原核生物含有一种酶称为逆旋转酶（reverse gyrase）。这种拓扑异构酶将 DNA 引入正超螺旋。含有此酶的生物是古生菌的一些种属，它们生长在极高的温度下（超嗜热菌，见 6.12 节和第 13 章）。有意思的一个例子是，炽热甲烷嗜热菌（*Methanothermus fervidus*），它含有像组蛋白那样的蛋白质，而且形成类似核小体的结构，在这个结构中，DNA 是正向超螺旋的（见 13.12 节）。

正向超螺旋可能是超嗜热菌中 DNA 不会热变性的原因所在。这一假说并无争议，因为逆旋转酶只存在于那些非常喜欢热的微生物中。像所有的细胞那样，为了利用 DNA 的遗传信息，细胞的 DNA 必须能够复制和转录。因此，无论细胞是否通过 DNA

促旋酶和逆旋转酶的活性来控制超螺旋的状态，在细胞中，DNA 的结构都是处于相当动态的过程中。

概念检查

很长的 DNA 分子由于它被超螺旋而能够包裹在细胞之中。在原核生物中，通过拓扑异构酶引入超螺旋。在真核生物的染色体中，DNA 围绕组蛋白缠绕，形成核小体结构。DNA 促旋酶在原核生物中是一种关键酶，它在 DNA 中引入负超螺旋，逆旋转酶引入正超螺旋。

◆ 为什么超螺旋很重要？

◆ 拓扑异构酶在细胞中发挥什么作用？

◆ DNA 促旋酶和逆旋转酶的活性有何不同？

7.4 染色体和其他遗传元件

含有遗传物质（大部分生物是 DNA，一些病毒则是 RNA）的结构称之为遗传元件（genetic element）。基因组（genome）是存在于病毒或细胞之中的成套基因的总和，虽然已知在原核生物中主要的遗传元件是染色体，但是还有其他的遗传元件存在，它们无论在原核生物中还是真核生物中都起着重要作用（表 7.1）。

表 7.1　遗传元件的种类

微生物	遗传因子	说明
原核生物	染色体	很长，通常环形，双链 DNA 分子
	质粒	相对较短，通常环形，双链 DNA 分子，在染色体之外
真核生物	染色体	很长，线性双链 DNA 分子
	质粒[a]	相对较短，通常环形和线性双链 DNA 分子，在染色体之外
所有生物	转座元件	总是存在于另一个双链 DNA 分子中
线粒体或叶绿体	染色体	中等长度的 DNA 分子，通常为环形
病毒	基因组	单链或双链 DNA 或 RNA 分子

a. 质粒在真核生物中不普遍。

染色体

在第 2.2 节中讨论了典型的原核生物细胞中存在单个染色体，它含有细胞的全部基因。尽管大多数原核生物含有单个染色体，但也有例外，有少数的原核生物（包括细菌和古生菌的一些种）含有两个染色体（表 7.2）。真核生物含有多个染色体的基因组。典型的原核生物染色体是环状 DNA 分子，而我们已知的所有真核生物染色体 DNA 是线性的。

在表 7.2 中给出了一些真核和原核生物的染色体的数量、大小与构型。注意细菌布氏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）的染色体是线性的，它引起成人的 lyme 氏疏螺旋体病（见 27.4 节）。在原核生物中线性染色体虽然不普遍，但也存在于几种细菌中，包括重要的产抗生素的链霉菌属（*Streptomyces*）（见 12.24 和 30.5 节）。有关微生物基因

组大小特征等相关的详细信息见第15章内容。

表7.2 生活在不同环境选择的微生物中染色体的大小、数目和形状

微生物	注释	大小/Mb[a]	染色体数目	基因形状
细菌				
生殖道支原体 *Mycoplasma genitalium*	细菌中最小的细胞基因组	0.58	1	环状
布氏疏螺旋体 *Borrelia burgdorferi*	引起Lyme氏疾病(第27章)	0.91[b]	1	线性
流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae*	革兰氏阴性,能引起疾病(第26章)	1.83[c]	1	环状
类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*	革兰氏阴性,光营养	4.00[d]	2	环状
枯草杆菌 *Bacillus subtilis*	革兰氏阳性,遗传模型	4.21	1	环状
大肠杆菌K-12 *Escherichia coli* K-12	革兰氏阴性,遗传模型	4.64[e]	1	环状
天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor*	放线菌,产抗生素(第12章)	8.66	1	线性
古生菌				
骑火球纳米古生菌 *Nanoarchaeum equines*	火球菌的寄生菌(第13章和第15章)	0.49	1	环状
詹氏甲烷球菌 *Methanococcus jannaschii*	产甲烷,生长在高温环境(第6章和第13章)	1.66	1	环状
深海火球菌 *Pyrococcus abyssi*	生长在高温环境(第6章和第13章)	1.77	1	环状
地中海盐杆菌新种NRCl *Halobacterium* sp. NRCl	生长在高盐环境(第6章和第13章)	2.57[f]	3	环状
硫磺矿硫化叶菌 *Sulfolobus solfataricus*	生长在高温和高酸性环境(第6章和第13章)	2.99	1	环状
真核生物[g]				
吸吮贾第虫 *Giardia lamblia*	鞭毛原生动物,引起急性胃肠炎(第14章)	12.00[h]	4	线性
酿酒酵母 *Saccharomyces cerebisiae*	酵母菌广泛用于科研和工业(第14章和第30章)	12.06[h]	16	线性
盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum*	细胞黏菌,发育模型(第14章)	34.0[d]	6	线性
嗜热性四膜虫 *Tetrahymena thermophila*	纤毛原生动物(第14章)	210.0	5	线性

a. Mb是兆碱基对。在真核生物中,基因组大小和染色体数目是指单倍体中(所列出的原核生物基因组已全部测序)。

b. 具有线性染色体,此生物的基因组还含有17个环形和线性质粒。基因组大小在0.5Mb以上。

c. 流感嗜血杆菌株Rd,是最早被测序的微生物。

d. 染色体Ⅰ3.1Mb染色体Ⅱ0.90Mb,菌株中5个质粒也被测序。

e. 报道的序列中不含F-质粒(见10.9节)和λ噬菌体(见9.11节),但在典型的大肠杆菌K-12菌株中两者是存在的。

f. 含有一个2.01Mb的大染色体和两个小染色体分别为0.19Mb和0.37Mb。

g. 列出的所有微生物都是单细胞的。

h. 酿酒酵母是最早基因组全部测序出来的真核生物。表中给出的基因组数目不包括线粒体基因和一些重复序列的全部拷贝。

在表7.2中列出的原核生物并不是随机的例子，其中包括古生菌和细菌的几个种，是已知的原核生物中最大的和最小的染色体的例子。表7.2中也给出了真核微生物的例子。在真核染色体中线性DNA分子含有特殊的DNA序列，称为端粒（telomere）。它存在于DNA的每一末端。在端粒之间有着丝粒（centromere），着丝粒在细胞分裂过程中对于染色体的分配是非常重要的。正如我们在第14章看到的那样（真核微生物），端粒在染色体的复制过程中起着重要作用（见14.6节和图14.12）。

典型的真核生物含有巨大的DNA，它所含有的DNA的量远远超过为编码细胞行使功能所必需的全部蛋白质所需DNA的量。例如，人类基因组中，仅有总DNA的3%编码蛋白质，而在细菌中编码蛋白质的DNA常常超过90%。在真核生物中，额外的DNA以内含子和重复序列的形式而存在，有些重复序列重复数十万遍。真核微生物比高等真核生物内含子少。例如，在啤酒酵母中大约70%的DNA编码蛋白质。真核生物的某些基因有许多拷贝，如那些编码tRNA和rRNA的基因。这些在原核生物中也存在重复，但通常最多也只是几个拷贝。

非染色体遗传元件

有一定数量的遗传元件不是细胞染色体。这里简要讨论一些非染色体遗传元件，包括病毒、质粒、线粒体基因组、叶绿体基因组和转座子。

病毒（virus）的基因组要么是DNA，要么是RNA。它们控制自身的复制，而且从一个细胞转移到另一个细胞。病毒的基因组也称为染色体，它含有病毒必需的基因而非宿主细胞所必需。因此它的功能明显区别于细胞染色体。病毒染色体即有线性也有环形。由于病毒经常引起疾病，所以研究病毒是很有意义的。我们在第9章和第16章讲病毒，在第26章和第27章讲病毒疾病。

质粒（plasmid）是独立于染色体之外并进行自主复制的遗传元件，绝大多数质粒是双链DNA，大部分是环形，有些也是线性的。质粒在两个方面不同于病毒：①它们不引起细胞的损害（一般它们是有益的）；②病毒有细胞外的形式，而质粒没有。虽然在几种真核生物中确认了质粒的存在，但质粒在大多数原核生物中存在，并且对这些生物具有重要作用。我们在第10章中讨论质粒。

许多原核生物含有一个或多个独立于染色体之外的质粒，一些质粒含有的基因所产生的蛋白质能够赋予宿主细胞重要特性，如对抗生素的抗性。那么，大质粒与染色体有什么区别呢？染色体中基因编码的产物涉及细胞的基本功能。例如，这些必要的基因被称为持家基因，一些持家基因编码细胞必需的蛋白质，如DNA和RNA的聚合酶，还有一些编码细胞必需的RNA，如rRNA和tRNA。相对染色体而言，质粒通常是可以消除的，而且它不含有在一切条件下用于生长所必需的基因。有许多在染色体上的基因是不必需的，但是含有持家基因的遗传元件则可称为染色体。

线粒体（mitochondrion）和叶绿体（chloroplast）是主要的真核细胞器。它们都含有小的染色体。而这些细胞器不仅含有DNA，而且还含有对于蛋白质合成（包括rRNA、tRNA和所有的其他的对于翻译和形成功能蛋白所必需）的全部机制。确实，这些细胞器与原核细胞具有许多类似的特点，表明它们与原核细胞在系统发育上有关（见2.3节和14.4节）。

转座元件（transposable element）是一段 DNA，它能够从染色体的一个位置移动到另一个位置。转座元件在原核和真核生物中都存在，并在遗传变异中起重要作用。在原核生物中转座元件有三种类型：插入序列、转座子和一些特异的病毒。

插入序列是最简单的类型，除了转座所必需的基因外，它们不携带任何基因信息。转座子相对较大，它包含其他的基因。我们将在第 10 章详细讨论。在第 16 章我们讨论一种细菌病毒——Mu，它本身是个转座元件。所有的转座元件的共同点是它们都作为 DNA 分子的一部分一起复制。

概念检查

在细胞中存在着一些除了染色体之外的遗传元件。质粒就是独立于细胞染色体之外的 DNA 分子。线粒体和叶绿体含有它们自己的 DNA 染色体。病毒含有 DNA 或者是 RNA 的基因组，控制着自身的复制。转座元件是作为其他遗传因子的一部分存在的。

- ◆ 什么是基因组？
- ◆ 在所有的细胞染色体中发现的遗传物质是什么？
- ◆ 原核生物中成为染色体所必需的是什么？

Ⅲ DNA 复制

生物信息流动从 DNA 复制（DNA replication）开始。DNA 复制对细胞分裂是必需的，对于一个单细胞微生物来说产生一个新的生物体，而对于一个多细胞生物来说产生一个新的细胞。DNA 复制的过程必须是在高保真情况下进行的，就如同一个子细胞在遗传上完全等同于母细胞。这个过程涉及专一性酶和酶促过程。

7.5 DNA 复制：模板和酶

细胞中的 DNA 以碱基对互补形成双螺旋的形式存在（图 7.3 和图 7.4）。如果 DNA 双螺旋松开，以亲链的每一条为互补链就能合成新链。如图 7.11 所示，复制是半保留性（semiconservative）的，这意味着产生的两个双螺旋是各由一个子代链和一个亲本链构成的。被拷贝的 DNA 分子称为模板，DNA 复制过程中每一个亲本链都是合成新链的模板（图 7.11）。

在复制过程中，要涉及酶的活性、前体的性质、DNA 化学性质，在方法上要涉及一些重要的限制作用，以便按照此方法合成新链 DNA。DNA 链中的每一个新核苷酸的前体都是核苷 5′-三磷酸，末端的 2 个磷酸去掉，内部的磷酸以共价键结合到生长链的脱氧核糖上（图 7.12）。核苷酸加到生长的链上需要一个自由羟基，这个自由羟基只有在分子的 3′端才有效。这种化学限制产生了一个重要的规律，就是 DNA 复制的基础：DNA 复制总是从 5′-磷酸端向 3′-羟基端进行，新加入的核苷酸 5′-磷酸与前面加入的核苷酸 3′-羟基相连接。

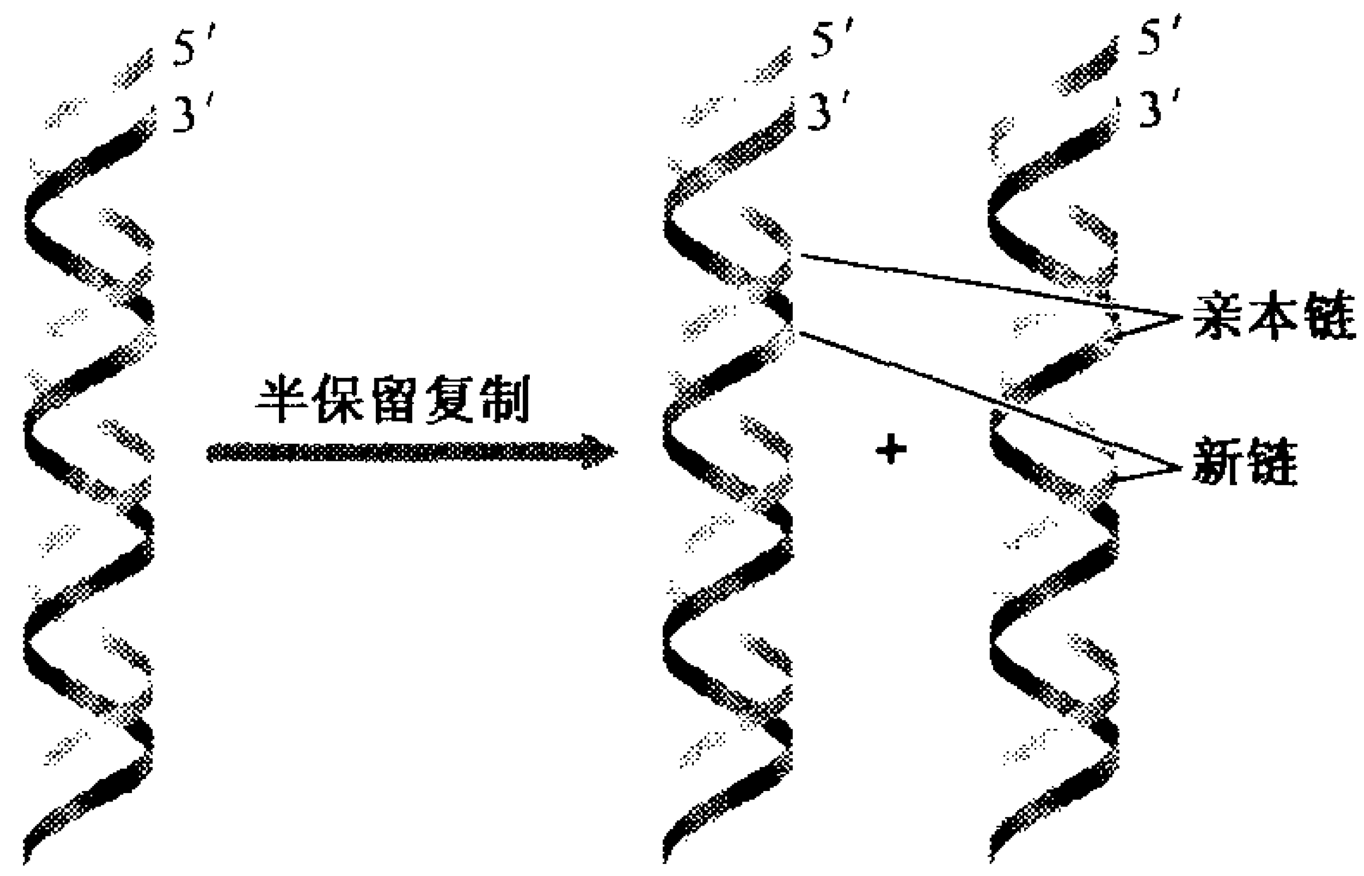


图 7.11　DNA 复制的简图。DNA 复制不论是在原核还是在真核生物中都是半保留复制过程。新合成的双螺旋含有一个新链和一个旧链。

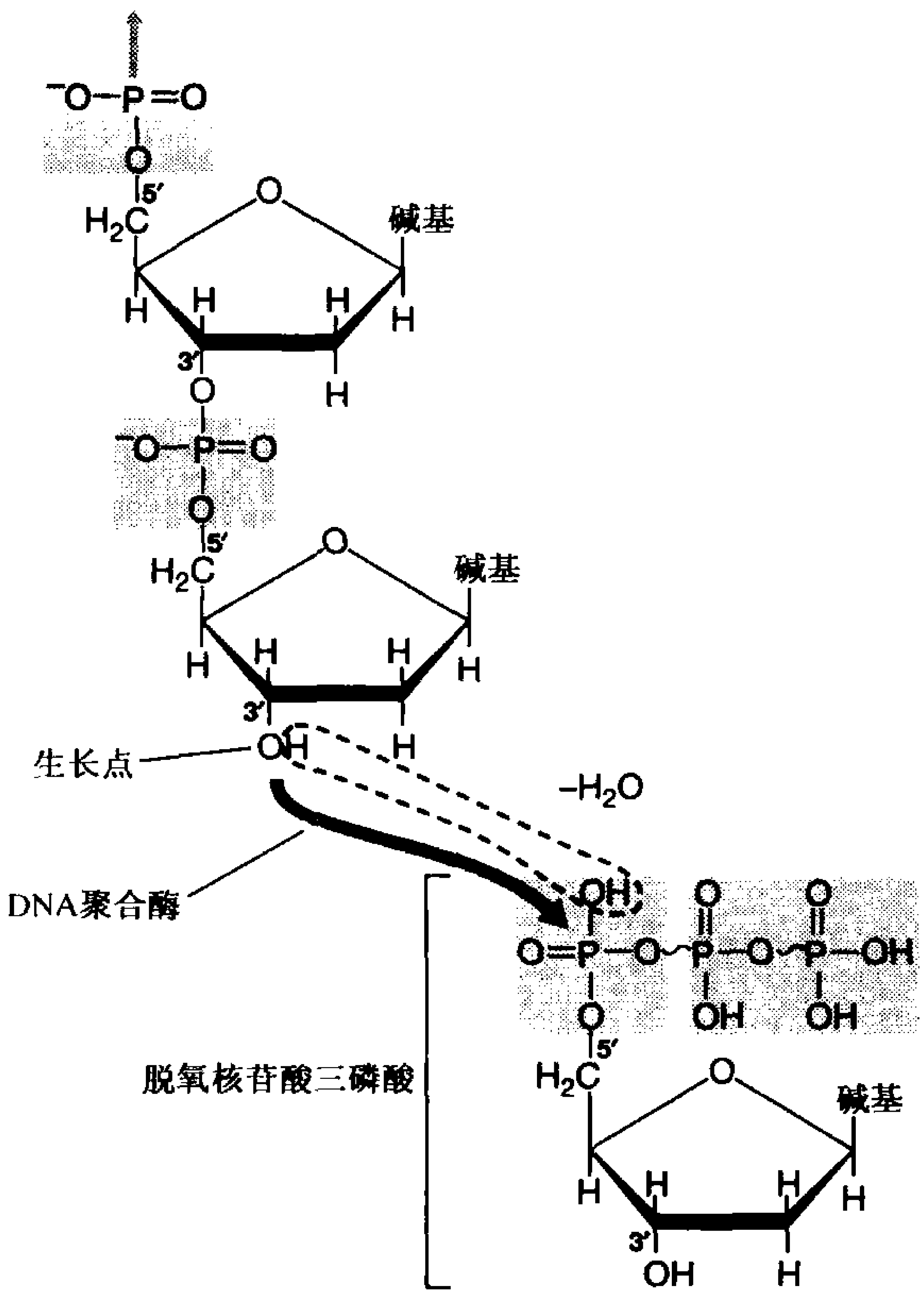


图 7.12　DNA 链的结构及在链的 3′端通过加入脱氧核苷酸使链生长的一个机制。从链的 5′-磷酸到 3′-羟基端的生长过程是 DNA 聚合酶催化的加入反应。作为前体的四种脱氧核苷酸是脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸（dTTP）、脱氧腺嘌呤核苷三磷酸（dATP）、脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸（dGTP）、脱氧胞嘧啶核苷三磷酸（dCTP）。随着核苷酸的插入，三磷酸的两个末端磷酸以焦磷酸（PPi）的形式放出。因此，加入 1 个核苷酸要消耗 2 个高能磷酸键。

DNA 聚合酶和引发酶

催化核苷酸加入核苷酸链的酶称为 DNA 聚合酶（DNA polymerase）。这样的酶有

数种，每一种都有独特的功能。我们知道所有 DNA 聚合酶催化新 DNA 的合成都是由 5′→3′方向。到目前还没有发现 DNA 聚合酶能够自己开始合成新链。所有 DNA 聚合酶只能将核苷酸加到预先存在的 3′-羟基上。因此，要开始合成一个新链，就必须有引物（primer）。在引物的一个位置上 DNA 聚合酶才能将第一个核苷酸加到引物上。大部分情况下，这个引物是一段短的 RNA 链。

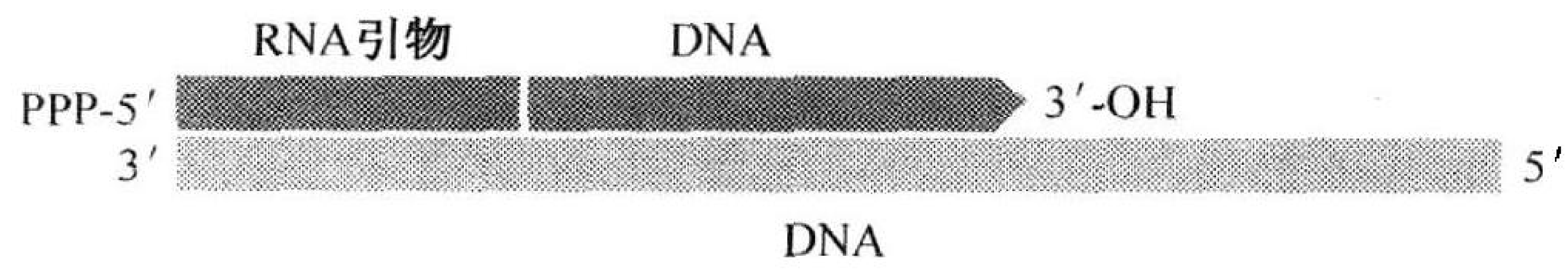


图 7.13 RNA 引物。在 DNA 合成起始中产生的 RNA-DNA 结合的构型。

当双链螺旋在复制起始点打开时，RNA 聚合酶首先起作用，产生一段 RNA 引物。这种特异起 RNA 聚合作用的酶称引发酶（primase），它合成出一小段延伸的 RNA（小于 15 个核苷酸）。在 RNA 引物生长的末端是 3′-OH，DNA 聚合酶能将第一个脱氧核糖核苷酸加到 3′-OH 上。引物一旦形成，分子的延伸将是 DNA 而不是 RNA。因此，新合成的分子有一个如图 6.15 所示的结构。引物最终将被去掉。

概念检查

DNA 螺旋的两条链都作为模板用于两条新链的合成（半保留复制，semiconservative replication）。两个子代双螺旋 DNA 的每一个都是由一个亲本链和一个新链组成。新链的延伸总是在 3′端加入核苷酸。DNA 聚合酶需要一个引物，新链的合成必须有引物才能开始，引物一般是 RNA。

- 正在合成中的 DNA 链，聚合酶加入一个碱基，是从（5′或 3′）哪一端加入的？
- 在 DNA 复制中，为什么要有引物？

7.6 DNA 复制：复制叉

DNA 复制的机制主要是以大肠杆菌为研究材料获得的。在下文中我们将主要以它为例讨论复制的主要内容。在所有的细菌中 DNA 复制大致相同。通过对比，尽管大部分古生菌含有环状的染色体，但是 DNA 复制的一系列过程更加类似于真核细胞，而不是细菌。这再次显示出古生菌与真核生物中的关系（见 2.3 节）。

DNA 合成的起始和先导链/后滞链

原核生物中，在染色体上有一个 DNA 合成起始的位置，称为复制原点（origin of replication）。复制原点是由大约 300 个碱基组成的特殊序列，能被特异的起始蛋白所识别，其中包括了一个结合在此处，为复制解开螺旋的关键起始蛋白（表 7.3）。然后 DNA 复制在两个单链上开始。DNA 复制进程中，复制位点称为复制叉（replication fork），沿 DNA 向下移动（图 7.14）。

表 7.3　在细菌中参与 DNA 复制的主要酶

酶	编码的基因	在细胞中功能
DNA 聚合酶Ⅲ	*polC*；*dnaE*、*O*、*N*、*X*；*holA-E*；*mutD*	主要起聚合作用
DNA 聚合酶Ⅰ	*polA*	切除 RNA 引物，填充 DNA 上的缺口
DNA 解旋酶	*dnaB*	在复制叉中解开螺旋
引发酶	*dnaG*	在 DNA 上引入新链
原点结合蛋白	*dnaA*	结合在复制叉的起始点；促进复合体解聚
单链结合蛋白	*ssb*	防止打开的螺旋退火
DNA 连接酶	*ligA*、*ligB*	连接 DNA 的切口

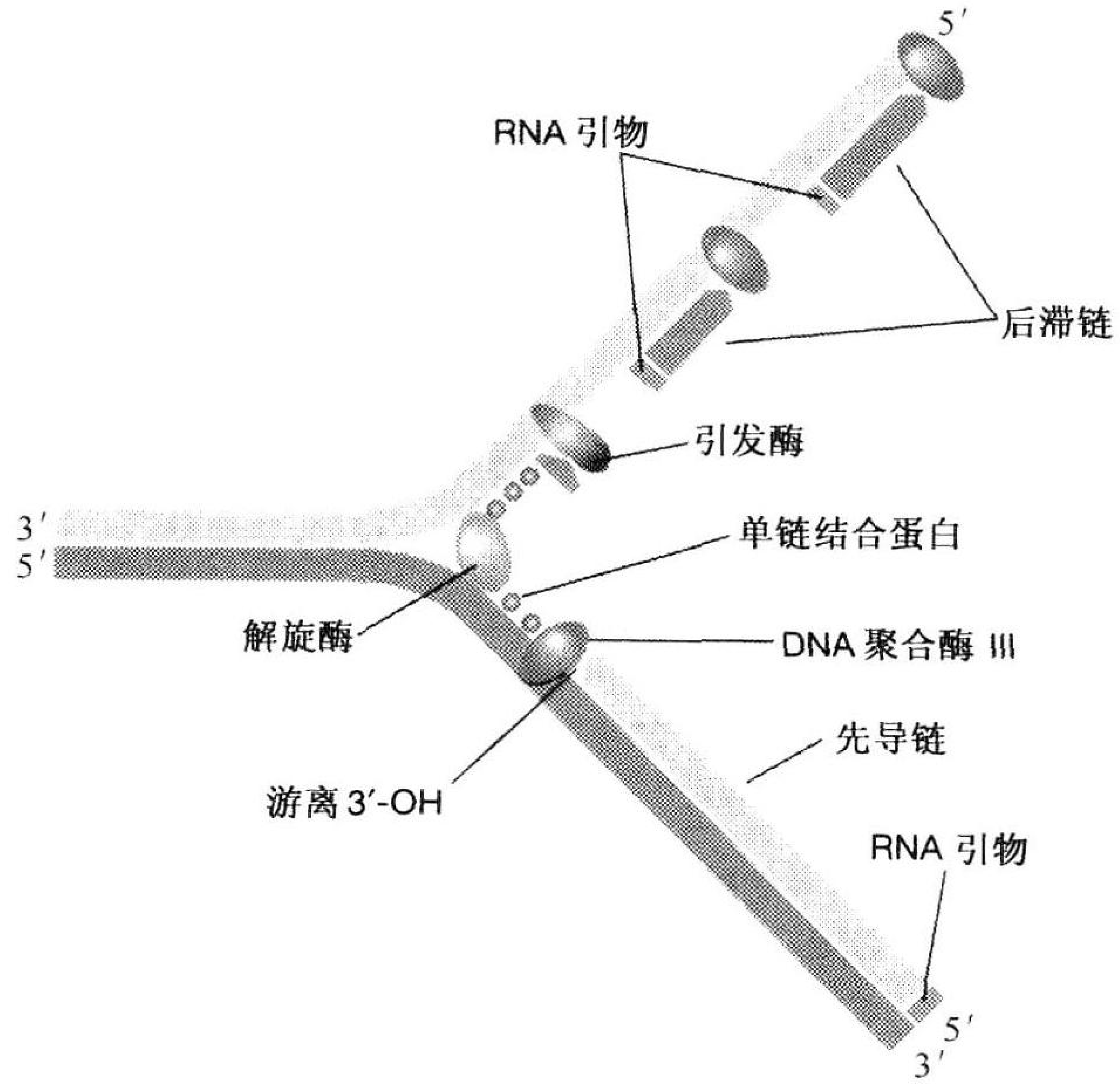


图 7.14　DNA 复制叉上的活动。注意 DNA 两条链的极性和反向平行特性。引发酶的作用底物是核苷酸三磷酸，而 DNA 聚合酶的底物是脱氧核苷酸三磷酸。单链结合蛋白是保持模板链通过一个解旋酶作用形成的一个单链态。对照图 7.19，所示的是复制体蛋白复合物。

在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中有 5 种不同的 DNA 聚合酶，聚合酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ。DNA 聚合酶Ⅲ（Pol Ⅲ）是 DNA 复制叉中主要的 DNA 复制酶。几种其他的非聚合酶也参与反应（表 7.3）。例如，在复制叉上，双链螺旋 DNA 解旋，通过被称为解旋酶的蛋白质作用暴露出一小段单链区，解旋酶是依赖于 ATP 的酶，通过水解 ATP 沿螺旋移动使复制叉前进（图 7.14 和图 7.15）。形成的单链区与特殊的蛋白质结合在一起，此蛋白质称单链结合蛋白（single-strand binding protein），它稳定单链 DNA，并防止链内氢键的形成和防止螺旋化。

在图 7.14 中揭示了两条复制链之间存在着的重要区别。事实上，DNA 的复制总是从 5′-磷酸向 3′-OH 方向进行（总是在生长链的 3′-OH 上加一个新的核苷酸）。DNA 链上生长方向从 5′-磷酸到 3′-OH 的称为先导链（leading strand），先导链的 DNA 合成是连续的，因为在复制叉上总有游离的 3′-OH，所以新的核苷酸能够加到 3′-OH 上。但是在相反的链——后滞链（lagging strand）上，DNA 的合成是不连续的（因为在复制

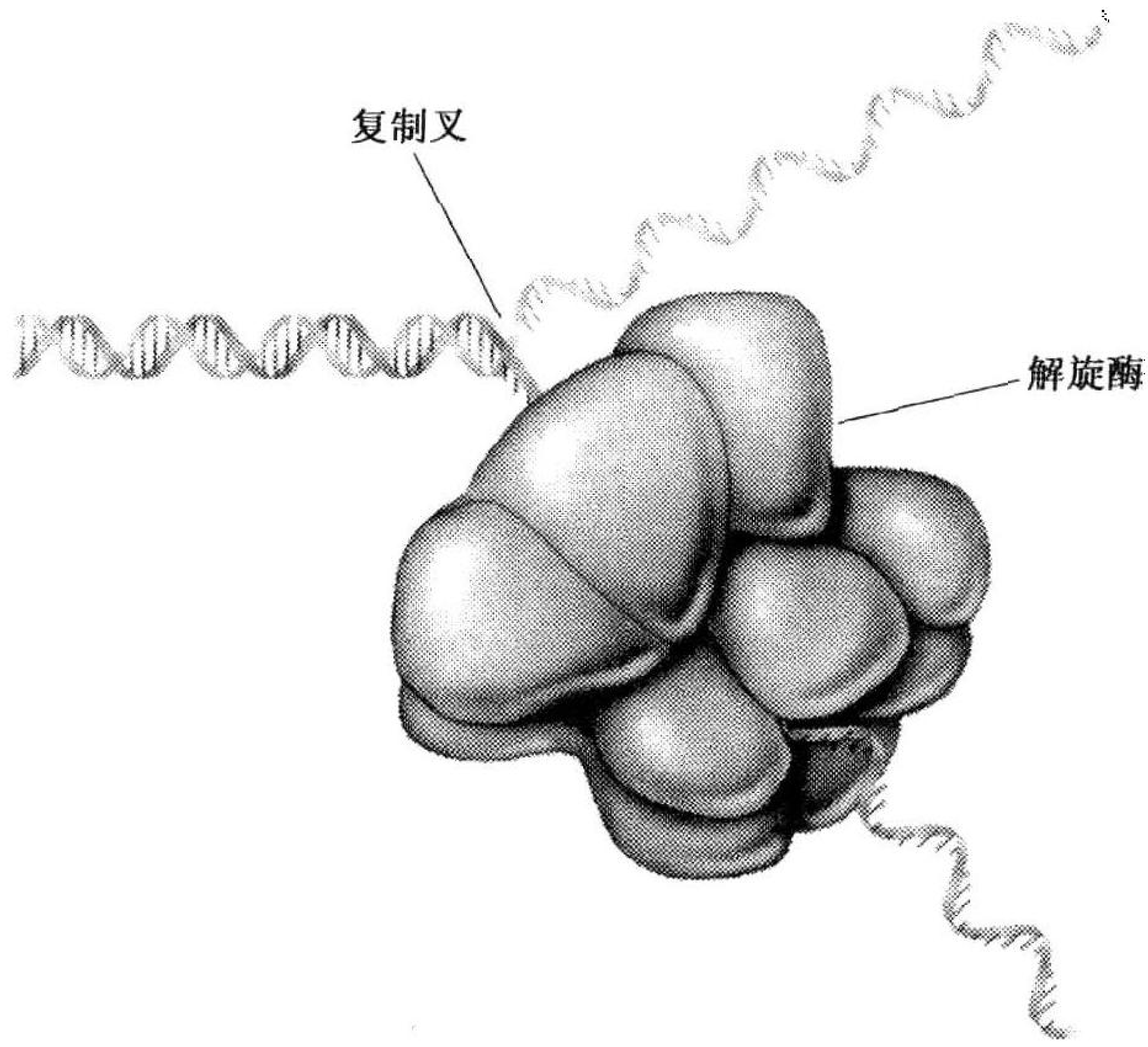


图 7.15　DNA 解旋酶解开双链螺旋。在图中，我们根据实际的大小比例，画出了蛋白质和 DNA 分子。一些简单的图解通常被用于解释细胞中的分子概念，但是它们会造成一个错误概念，那就是许多蛋白质比 DNA 还小。这个模型用不同的方法将它们的大小关系表现出来了。

叉上没有 3′-OH，新的核苷酸不能结合上去)。那么在这条链上 3′-OH 在哪里？在与生长点相反的一端。因此，在后滞链上，一小段 RNA 引物必须先由引发酶合成以提供游离 3′-OH。相反，先导链只在原点进行一条链复制起始。

引物合成之后，Pol Ⅲ取代引发酶。Pol Ⅲ是包括聚合酶核心复合体本身在内的 10 个蛋白质的复合体。其他蛋白质包括一些保持聚合酶在模板 DNA 上滑动的蛋白质，而且还有那些复制体辅助蛋白（后文介绍）。Pol Ⅲ加入脱氧核苷三磷酸一直到达先前合成的 DNA（图 7.16）。在这点上，Pol Ⅲ停下来，下一个 DNA 聚合酶Ⅰ（Pol Ⅰ）参与反应，它含有一种以上的酶活性。Pol Ⅰ除了 5′→3′合成 DNA 外，还有核酸外切酶活性，以除去先前的 RNA 引物（图 7.16）。当引物除去后用 DNA 来取代，Pol Ⅰ被释放。最后通过 DNA 连接酶（DNA ligase）形成磷酸键。DNA 连接酶能够封闭 DNA 中有 5′-磷酸和 3′-OH 的切口。它还随 Pol Ⅰ一起修复 DNA。

染色体的双向复制和复制体

与大部分原核生物的情况相同。大肠杆菌染色体是环形 DNA。从复制原点开始双向复制（图 7.17 和图 7.18），因此在一个染色体上有两个复制叉，以相反方向复制。在环形 DNA 中，双向复制会形成一个独特的形状，称为 θ 结构（theta structure）（图 7.17）。大部分长的 DNA 分子，不论是原核生物还是真核生物的 DNA，都从一个固定的起始位点进行双向复制。一个真核生物的染色体有许多复制起点，DNA 复制的严密性表现在每一个模板链以先导链和后滞链的方式合成 DNA（图 7.18）。

DNA 合成沿着环形染色体进行双向 DNA 复制，并尽可能地迅速。即使这样考虑，并将 Pol Ⅲ加入核苷酸到生长的 DNA 链上以大约每分钟是 1000 个的速率计算，大肠杆菌染色体的复制仍然要用 40min。在最好的生长条件下，大肠杆菌细胞增加 1 倍，大约

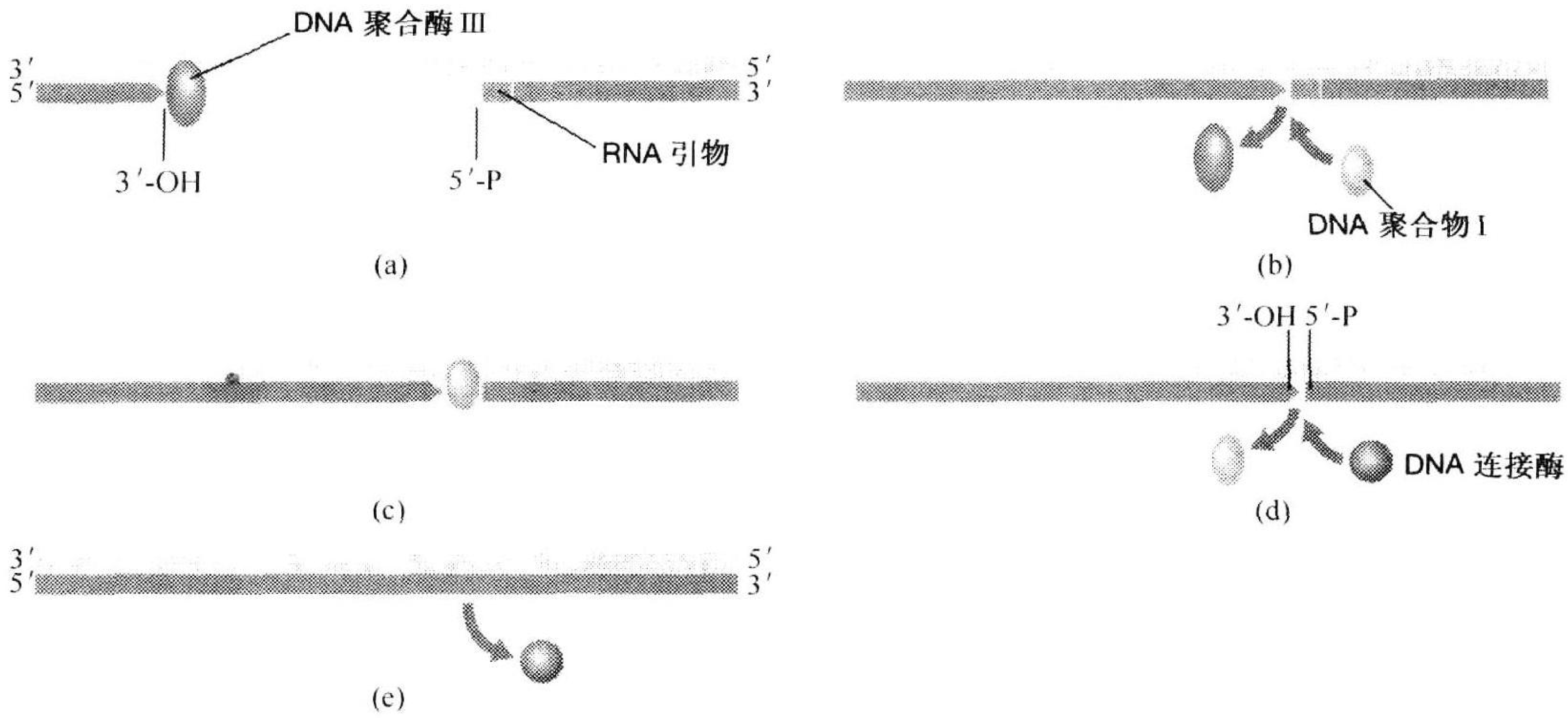


图 7.16　在后滞链上连接两个片段。(a) DNA 聚合酶Ⅲ正在向着后滞链上合成的前一个 RNA 引物以 5′→3′的方向合成 DNA。(b) 在到达引物片段时，DNA 聚合酶Ⅰ取代Ⅲ。(c) DNA 聚合酶Ⅰ除去 RNA 引物，继续合成 DNA。(d) 除去引物后，DNA 连接酶取代 PolⅠ。(e) DNA 连接酶将两个片段连接在一起。

用 20min。然而在这些条件下，染色体复制仍然用 40min，要解开这个谜，就是大肠杆菌细胞增长 2 倍，要少于 40min，就是细菌 DNA 上有许多复制叉。也就是说最近的一个复制环完成之前，DNA 复制的一个新环又开始了。只有这种方式才能实现世代增殖时间比染色体复制时间短。

复制体

当 DNA 复制在复制叉进行时，DNA 的卷曲螺旋就发生变化，通过一个拓扑异构酶来改变（见 7.3 节）。不卷曲是 DNA 复制的基本特征，因为超螺旋 DNA 处于紧密状态下，它比非超螺旋 DNA 更容易解链。因此，通过调节超螺旋的程度，拓扑异构酶来调节复制过程（同样调节转录，后叙）。

图 7.14 显示了先导链和后滞链复制的区别及几种不同的酶的参与。通过这个简图将表现出每一个复制叉都含有独立工作的不同蛋白质。事实并不是这样的。在这个过程中参与的蛋白质是动态的并且合成了一个称为复制体（replisome）的大复合物（图 7.19）。DNA 的后滞链环化使复制体在两链上光滑移动，当复制发生的时候复制体拉着 DNA 模板通过它（图 7.19）。因此，是 DNA 而不是 DNA 聚合酶在复制过程中移动。值得注意的是，在复制体中解旋酶和

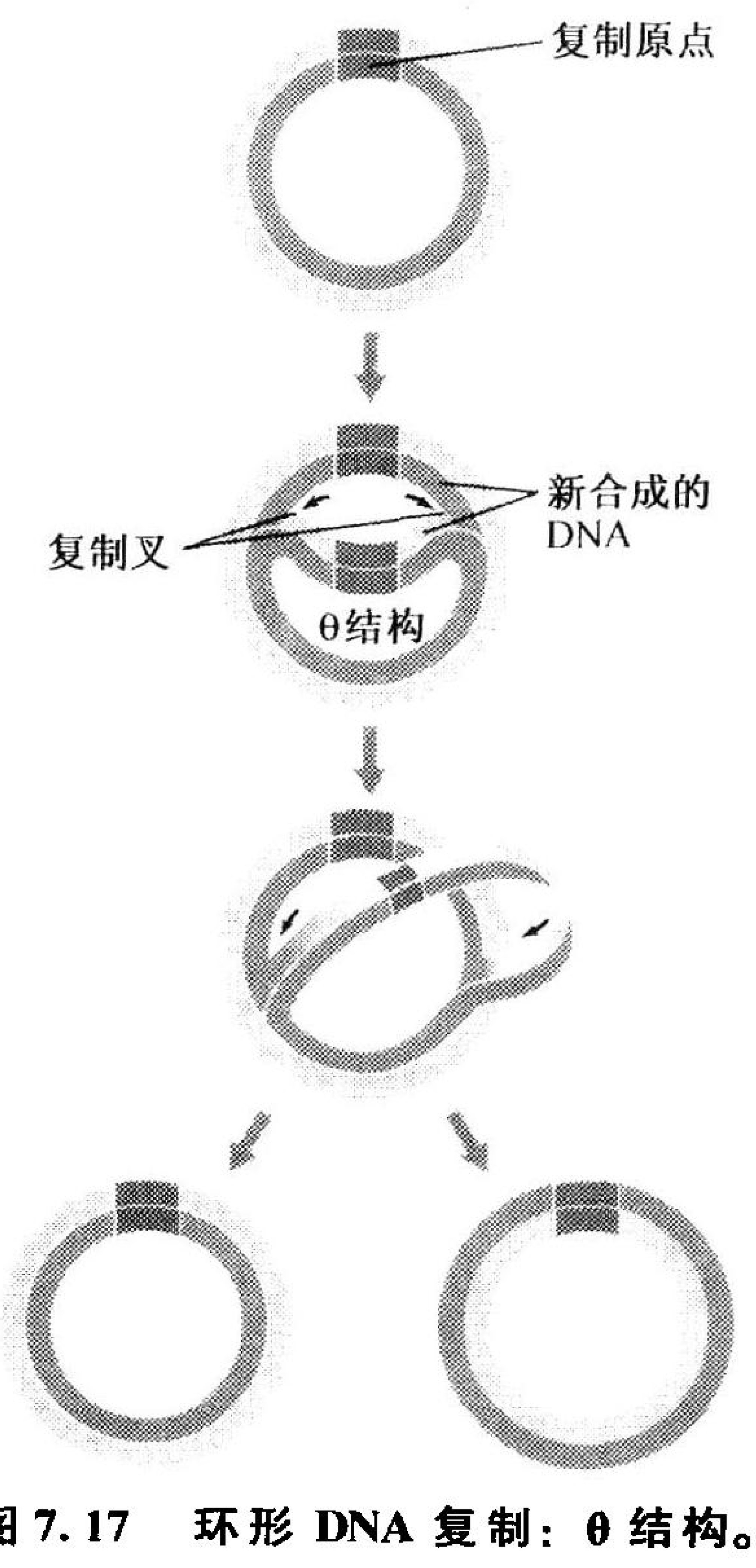


图 7.17　环形 DNA 复制：θ 结构。环形 DNA 从原点双方向复制形成的复制中间体类似希腊字母 θ。

引发酶是怎样形成复合物［称引发体（primosome）］，因为它们在复制过程中必须紧密配合发挥作用（图 7.19）。

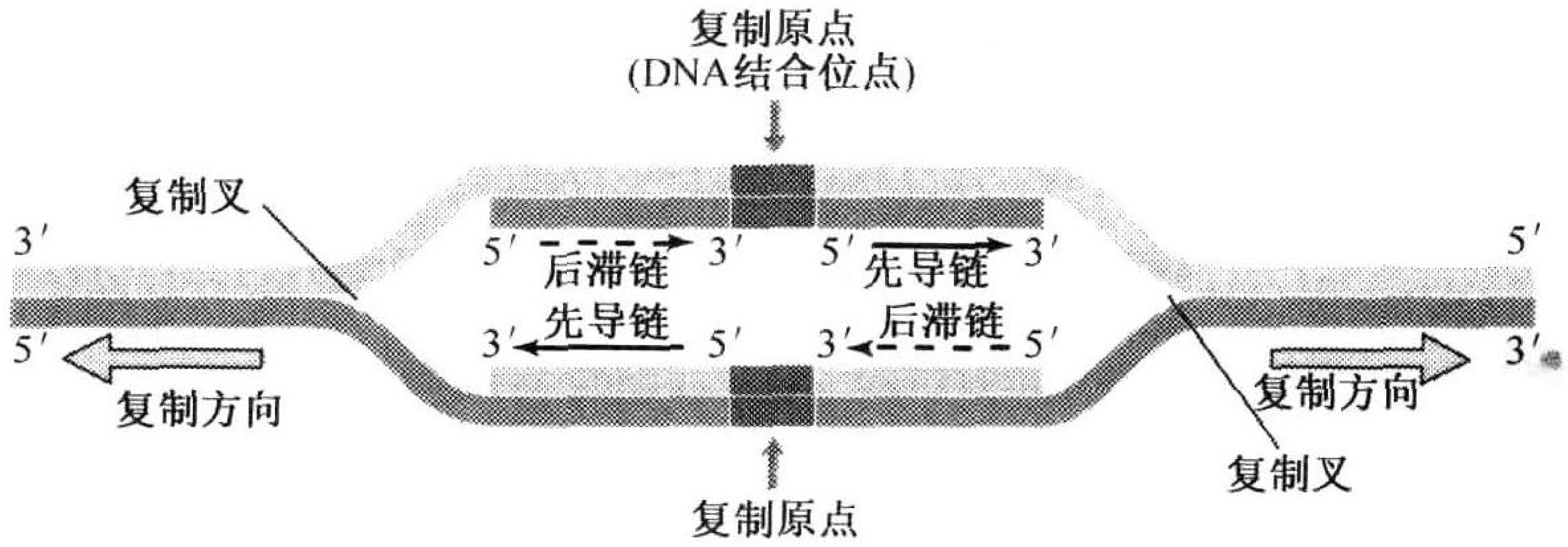


图 7.18　在环形染色体中的双重复制叉。在一个复制原点进行双向复制，必须有 2 个复制叉。因此在每一个方向先导链必须先行。大肠杆菌复制原点通过特异蛋白质 Dna A 的结合来确认（表 7.3）。

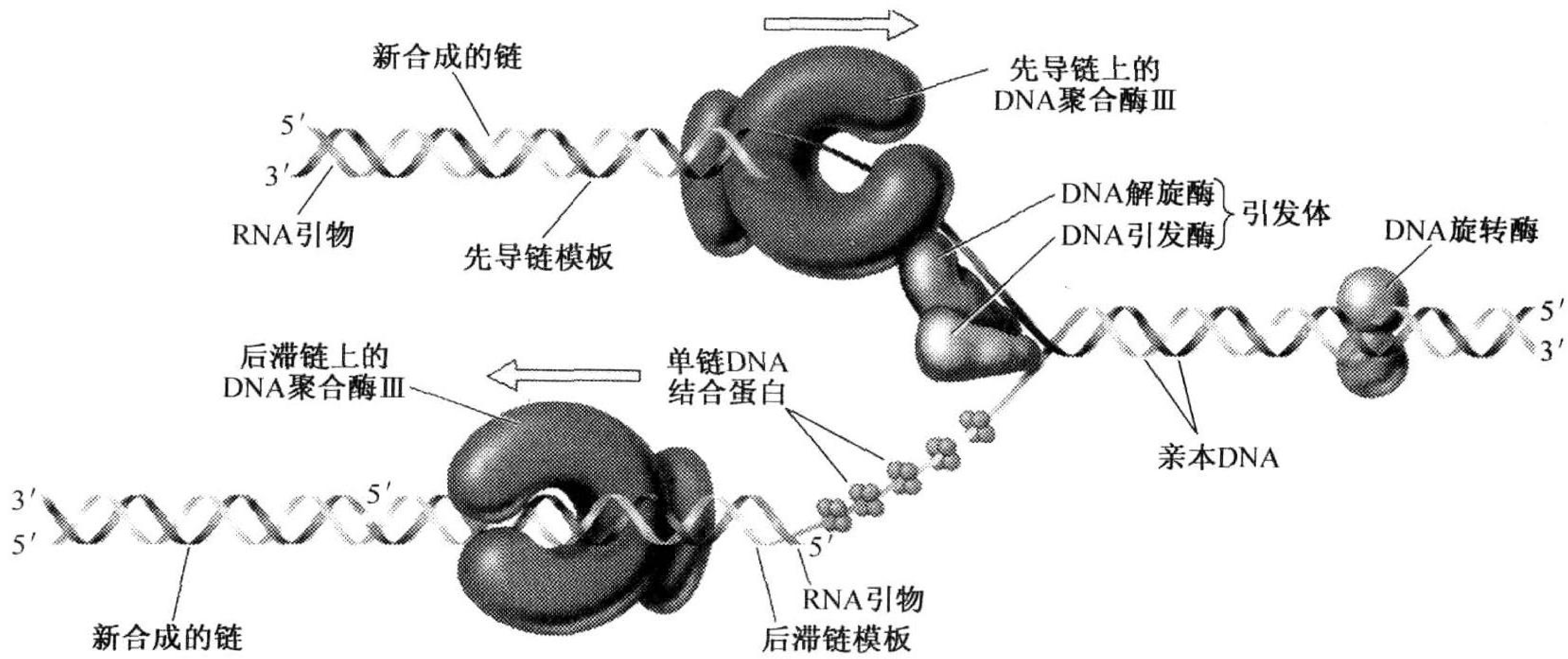


图 7.19　复制体。复制体包括 2 个 DNA 聚合酶Ⅲ，解旋酶和引发酶（在一起形成一个引发体），还有许多单链 DNA 结合蛋白。复制体的上游，DNA 螺旋酶正在解除超螺旋。注意后滞链模板如何环化来使复制体的组成部分相互之间远离并且光滑移动。

总而言之，复制体含有除了 DNA 聚合酶之外的几个关键的复制蛋白：①DNA 促旋酶解除超螺旋；②DNA 解旋酶/引发酶（引发体），解开卷曲并引发 DNA 合成；③单链结合蛋白，防止分离开的模板链再形成双螺旋。表 7.3 概括了一些参与 DNA 复制的基本蛋白质特性。

DNA 复制的保真性：校正

DNA 复制中的错误会引起突变（mutation），它是 DNA 序列的变化。在细胞中的突变率异常的低，一个错误的碱基对掺入引起的突变的概率为 10^{-8}～10^{-11}。保持这种精确度的原因一部分是 DNA 聚合酶的作用，它能有两次机会使正确的碱基能够结合到已给出的位置上。第一次机会是根据碱基配对原则 A 与 T、G 与 C 插入互补的碱基，利用模板链作模子。第二次机会是由于两个酶的活性，即聚合酶Ⅰ和聚合酶Ⅲ的活性，

称为校正（proofreading）（图 7.20）。

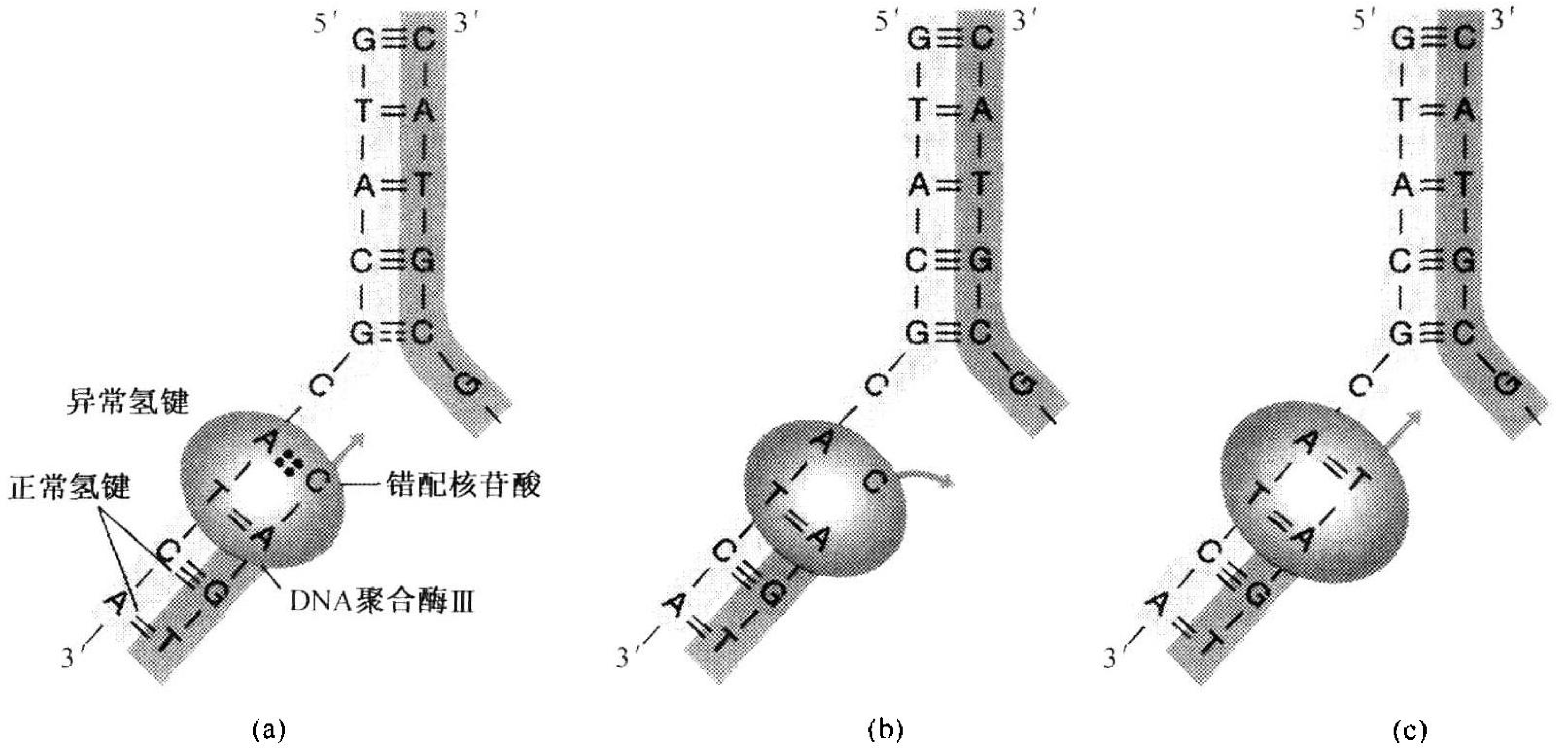


图 7.20 通过 DNA 聚合酶Ⅲ3′→5′方向外切核酸酶活性校正。（a）在末端的碱基对出现错配引起聚合酶的短暂停留，这是一个校正的信号。（b）结合上正确的碱基之后，切除错配的核苷酸。（c）通过聚合酶活性结合正确碱基。

如何进行校正呢？除了在复制链中插入单核苷酸，DNA 聚合酶Ⅰ和聚合酶Ⅲ还含有 3′→5′外切核酸酶（exonuclease）活性（exo 意味着末端），它能够去除错误插入的核苷酸而用正确的核苷酸取代之。如果一个不正确的碱基插入，由于错误碱基造成不稳定的碱基配对所以就唤起聚合酶的校正活性。由于错误插入核苷酸被聚合酶所识别，它的错配使它不能形成一个正确的氢键模式。DNA 聚合酶校正活性给予了正确碱基插入第二次机会（图 7.20）。

核酸外切酶的校正作用不同于聚合酶Ⅰ的 5′→3′方向的外切酶活性，因为聚合酶Ⅰ是用于去除先导链和后滞链的 RNA 引物（图 7.16）。只有 PolⅠ才有后者的活性。核酸外切酶的校正作用在原核生物、真核生物和病毒 DNA 的复制系统中都存在。然而还有很多微生物有另外的机制来减少 DNA 复制过程中产生的错误，将在第 10 章中讨论。

复制的终止

复制叉终止的详细过程目前还不是特别清楚。然而我们知道 DNA 的某些序列和几种蛋白质参与此过程。当环状分子复制完成的时候（图 7.17），两个环状分子被连在一起，像一条链子。通过一个拓扑异构酶而断开连接。在第 6 章中我们将概括细胞壁是怎样合成和 DNA 复制与细胞分裂相偶联（见 6.2 节）。显然，这是一个临界现象，那就是在 DNA 复制之后，DNA 被分开了，所以每一个子细胞都有一个染色体。这个过程是通过一个重要的称为 FtsZ 的细胞分裂蛋白帮助完成的，这个重要的蛋白质在细胞分裂的几个关键步骤中起了很大作用（见 6.2 节）。

概念检查

DNA合成开始于一个称为复制原点的唯一位置。双链螺旋通过解旋酶解旋，通过单链结合蛋白稳定单链。DNA的延伸在先导链上是连续的延伸，而在后滞链上是不连续的。碱基配对中出现的大部分错误是通过与DNA聚合酶有关的校正功能来修正的。

◆ 为什么有先导链和后滞链?

◆ 什么是复制体及它的成分是什么?

◆ 为什么对于细胞来说校正是如此的重要?

Ⅳ 操作DNA的工具

7.7 限制酶和杂交

典型的原核细胞含有一种或多种能够对DNA进行化学修饰的酶。主要一类是限制性内切核酸酶，简称限制酶（restriction enzyme）。虽然这个系统在原核细胞当中非常普遍（细菌和古生菌），但它们在真核细胞中是稀少的。限制酶能够识别DNA的某些序列并切开它。除了在细胞当中发挥重要作用之外，限制酶对于体外DNA操作是必要的工具，并且它们的发现促进了基因工程的诞生（第31章）。

限制酶的作用机制

主要的一类限制性内切核酸酶是Ⅱ型限制酶。由Ⅱ型限制酶识别的许多DNA序列显示出二重对称结构。图7.21所示的是来自于大肠杆菌中称为*Eco*RⅠ（*Escherichia coli* restriction enzymeⅠ）的限制性内切核酸酶识别和切割的序列。酶切割位点用箭头表示，二重对称轴用虚线表示。我们看到两条链的一个从左边读，另一条从右边读的话，是同样的序列。这个结构称为回文对称序列（palindrome）（回文结构的术语是由希腊语衍生而来，原来的意思是再跑回来）。

许多限制性内切核酸酶是由两个相同的亚基组成，每一个亚基负责一条DNA单链的识别和切割。由于限制性内切核酸酶识别的序列相当短而且常常是回文序列，所以这样的限制性内切核酸酶总是使双链断开，使DNA链露出一个短的单链区域而不是切割DNA产生一个平头末端（图7.21）。几种限制内切核酸酶识别序列和切割位点在表7.4中列出。

表7.4 几种限制性内切核酸酶的识别序列

微生物	限制酶名称[a]	识别序列[b]
球形芽孢杆菌(*Bacillus globigii*)	*Bgl* Ⅱ	A↓GATCT
枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)	*Bsu*R Ⅰ	GG↓C*C
白色短杆菌(*Brebibacterium albidum*)	*Bal* Ⅰ	TGG↓C*CA
大肠杆菌(*Escherichia coli*)	*Eco*R Ⅰ	G↓AA*TTC[c]

续表

微生物	限制酶名称[a]	识别序列[b]
溶血性嗜血杆菌(*Haemophilus haemolyticus*)	*Hha* Ⅰ	G C*G↓C
流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)	*Hind* Ⅱ	GTPy↓PuA C*
流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)	*Hind* Ⅲ	A↓AGCTT
肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)	*Kpn* Ⅰ	GGTAC↓C
豚鼠耿诺卡氏菌(*Nocardia otitidiscaviarum*)	*Not* Ⅰ	GC↓GG C*CGC
普通变形菌(*Proteus vulgaris*)	*Pvu* Ⅰ	CGAT↓CG
黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)	*Sma* Ⅰ	CCC↓GGG
水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)	*Taq* Ⅰ	T↓CG A*

a. 限制性内切核酸酶命名的 3 个字母缩写的第一个字母是代表产生此酶的微生物的属名，后面两个字母是种名。罗马数字表示的是在微生物中发现此酶的顺序，其他附缀的字母是种名。

b. 箭头指出的是酶作用的位点。星号指出的是甲基化的位点。G，鸟嘌呤；C，胞嘧啶；A，腺嘌呤；T，胸腺嘧啶。Pu，任意嘌呤；Py，任意嘧啶。只标出了 5′→3′方向的序列。

c. 看图 7.21a。

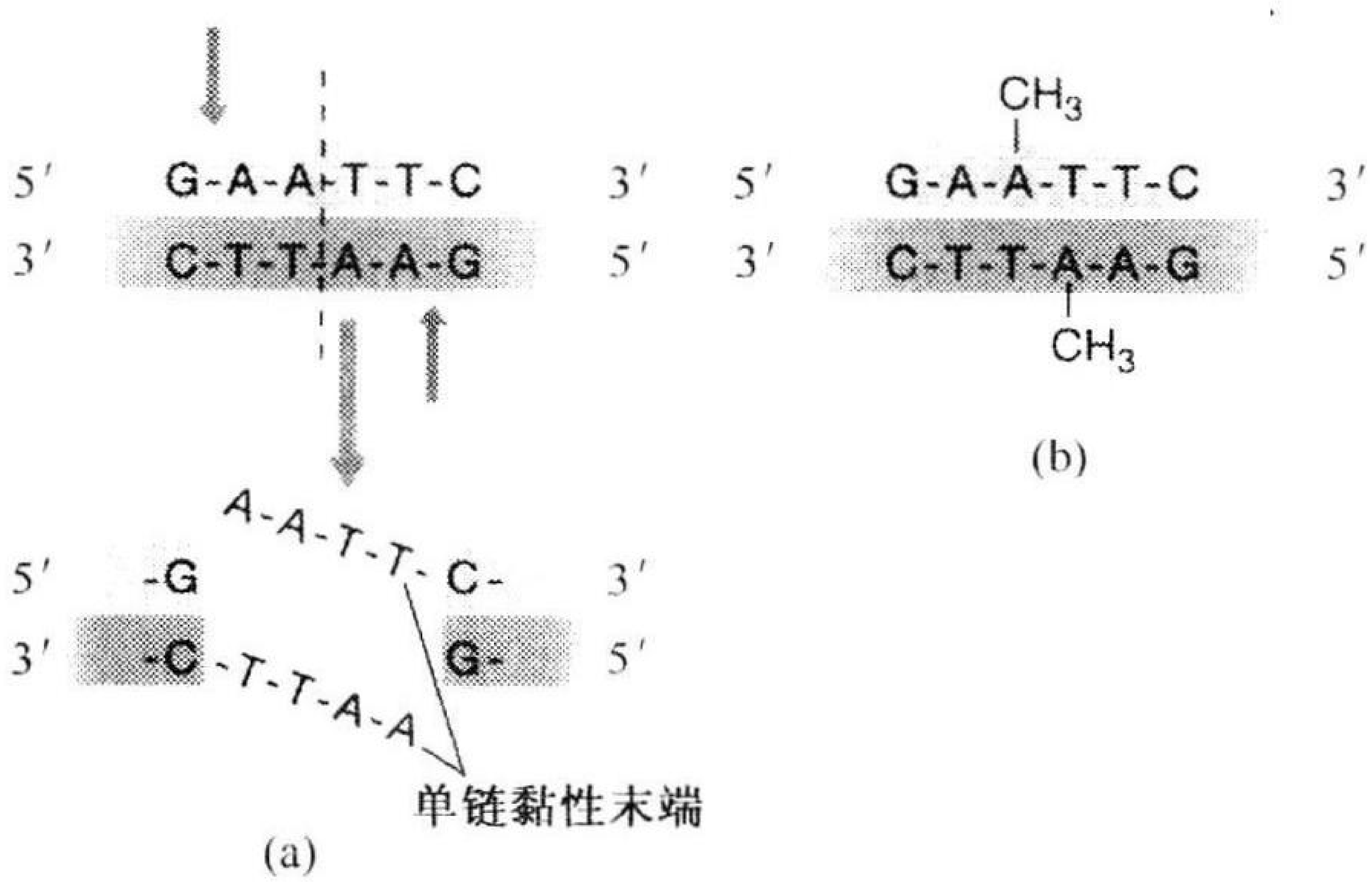


图 7.21 DNA 的限制和修饰。(a) 限制性内切核酸酶 *Eco*RⅠ识别的 DNA 序列。黑箭头表示由酶切开的键，虚线指出的是回文序列的对称轴。最下面的图显示出经限制性内切核酸酶 *Eco*RⅠ切割后 DNA 的形式。注意单链黏性末端（见 10.15 节）。(b) *Eco*RⅠ甲基化酶修饰后的同一个序列，显示出由此酶加入了个甲基，并保护由 *Eco*RⅠ切割的限制位点。

已知的限制性内切核酸酶有 2000 多种，它们具有 200 多种序列识别特性。科学家们正在寻找一些其他的限制性内切核酸酶，因为这些酶在基因研究中非常重要。*Eco*RⅠ限制性内切核酸酶能够切割任意含有其特异识别序列的双链 DNA。例如，一个特殊的 6 个碱基对的序列，就像 *Eco*RⅠ限制性内切核酸酶切割的那个序列（图 7.21），假定 DNA 是个随机的序列，在基因组中每 4096 个碱基对就随机出现一次（4 个碱基对在 6 个位置上的随机重排是 4^6）。正像我们在第 10 章和第 31 章阐述的那样，这些片段含有特定的有用的末端，尤其是用于基因克隆技术。限制性内切核酸酶在现代分子遗传研究当中是非常重要的工具，以至于它们都很容易通过商业途径获得。

修饰：防御限制作用

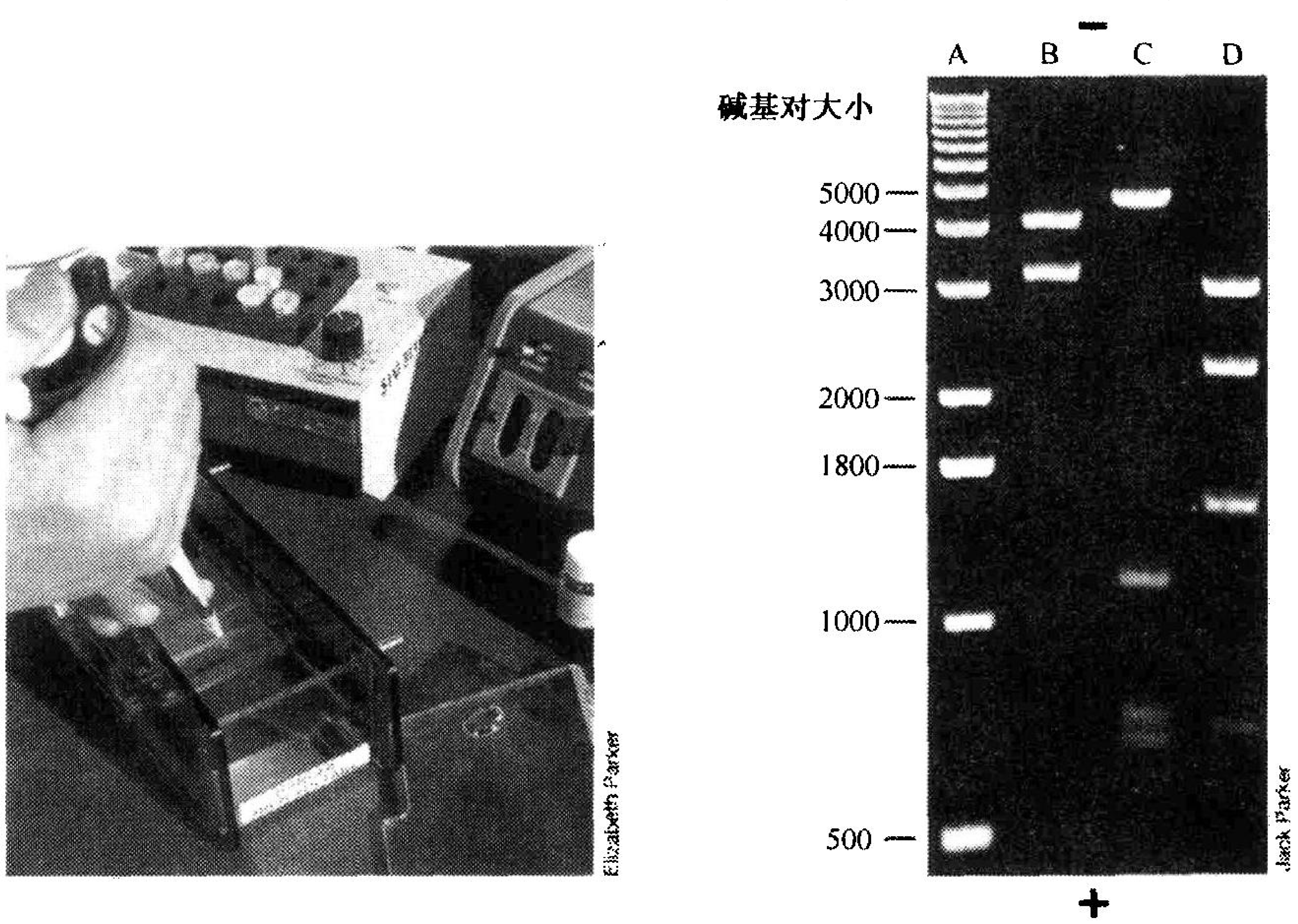
原核生物中的限制性内切核酸酶的主要功能大体是保护细胞免受外源 DNA 的侵

扰，如病毒 DNA。如果这样的 DNA 进入了细胞，细胞的限制酶将破坏它。然而，一个细胞必须要防止它自己的限制酶由于疏忽而破坏自身的 DNA，这样的防护是由修饰系统（modification system）来给予的。这种修饰系统主要是由修饰酶组成的，它是在它自身的特殊 DNA 序列上进行化学修饰，所以这个序列就不能被细胞自身的限制酶切割。修饰作用一般是指在识别序列中特定碱基的甲基化，使限制性内切核酸酶不能充分作用。例如，由 *Eco*R Ⅰ识别的序列（图 7.21a）能通过它内部两个腺嘌呤的甲基化被修饰（图 7.21b）。进行这种修饰作用的酶称为 *Eco*R Ⅰ甲基化酶。即使一个单链被修饰，这个序列也不再是 *Eco*R Ⅰ限制性内切核酸酶的底物。

DNA 限制酶分析及电泳

由于由许多限制性内切核酸酶识别的碱基序列是 4～6 个核苷酸（表 7.4），一般在一个单一的分子中这样的序列是有限的（图 7.23）。DNA 切割之后，产生的片段可以通过凝胶电泳（gel electrophoresis）分离和分析。

电泳是带电分子在电场中迁移的过程，迁移率是通过分子的大小、形状和分子的电荷来测定的。在凝胶电泳中（图 7.22a），分子是在琼脂糖凝胶中被分离。当有电流的时候，核苷酸（是负电荷）将通过凝胶而移动，而且小的或紧密的分子比大的分子迁移的迅速。在一段时间以后 DNA 能够被结合在凝胶中的化合物溴化乙锭（ethidium bromide）“染色”（见 10.3 节），在紫外光下 DNA 将发出荧光（图 7.22b）。



(a) (b)

图 7.22 DNA 的琼脂糖凝胶电泳。(a) DNA 样品点入琼脂糖凝胶孔中。(b) 一个染色的琼脂糖凝胶电泳图。如图所示，DNA 点入的孔在胶的顶端（是负极），电场的正极在下边。A 泳道样品片段的大小已知，它们可以作为分子质量标准，利用该标准分子质量，能够测定出其他泳道 DNA 片段的大小。在凝胶底部 DNA 区带的染色不那么重，因为这些片段较小，DNA 的化学染色少。

在图 7.22b 中显示了一个典型的琼脂糖凝胶电泳结果。在泳道中显示出标准 DNA 样品经限制酶消化的结果，因此每一个带的大小都可以测出。在其他的泳道里有纯化的 DNA（质粒）经一种或多种限制酶切割的结果。因为一个已知的限制酶它总是切割同样的位点，DNA 的区带形状是重复性的。通过与标准带的比较，片段的大小可以被测定。这个技术能够被用于制作 DNA 的限制内切图谱（restriction map）。用荧光显微镜来观察单个 DNA 分子的限制酶酶切作用就可以获得一个限制性图谱（图 7.23）。它被称为视觉图谱（optical mapping）。

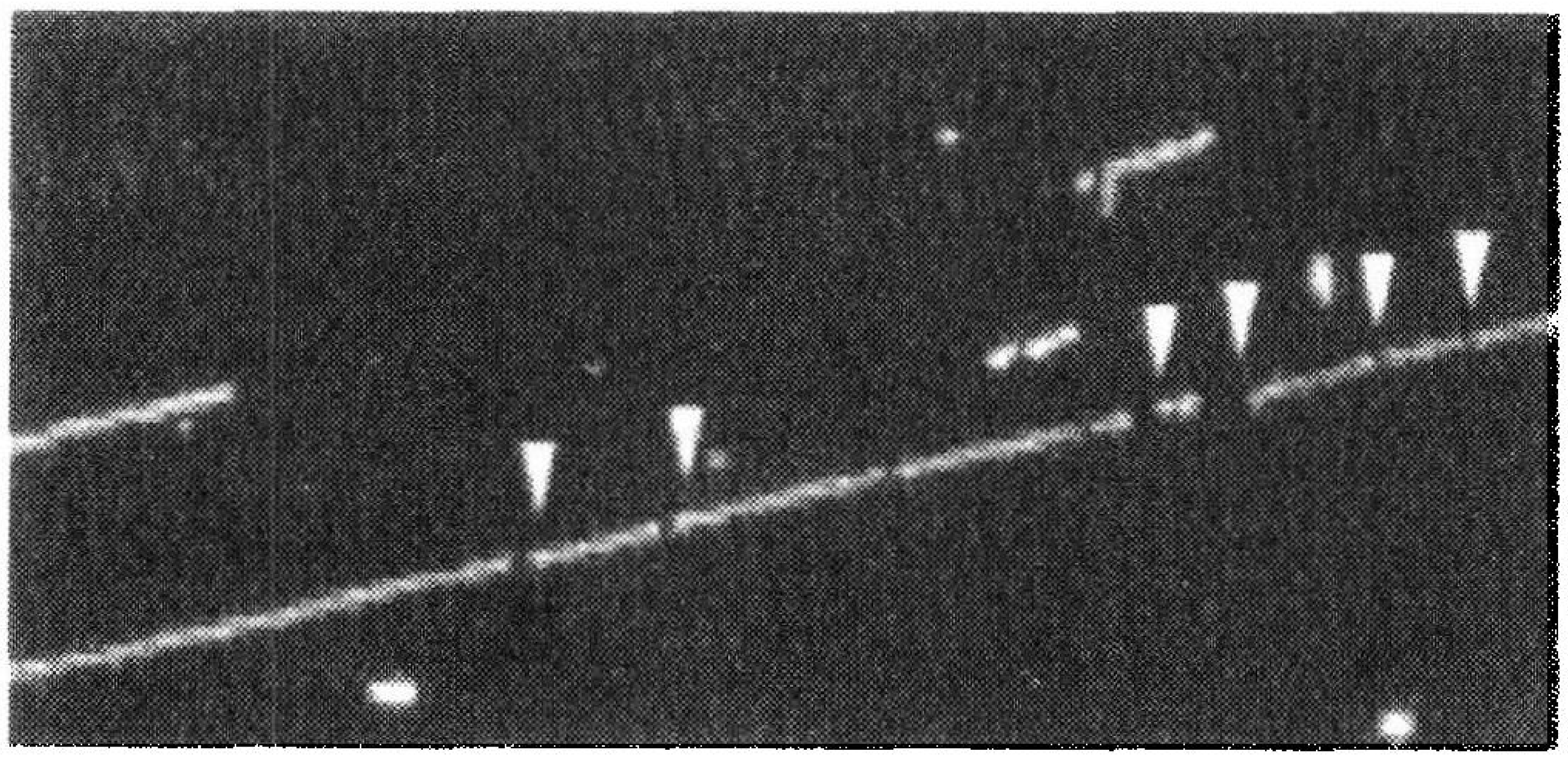


图 7.23　限制片段的光学图谱。该照片是大肠杆菌染色体的一部分通过限制酶 *Xho* Ⅰ 消化的结果的数码荧光显微照片。箭头所指出的是限制酶切割位点。尽管 DNA 链用光学显微镜看着很小，但是通过 DNA 的荧光还是能够观察到的。DNA 的长度大概是 260kb。光学图谱已经用于大肠杆菌和其他细菌完整染色体限制酶酶切图谱的建立。

限制分析在微生物学中有很多用处，主要用于一个或多个 DNA 分子的比较研究。该研究包含了微生物的分类研究。例如，一系列的微生物整体基因或特定基因经过限制分析产生的带型能够揭示它们的遗传关系（见 11.1 节）。

利用一种或者混合使用多种限制酶进行 DNA 的消化，所产生的带型可以解释不同 DNA 分子之间的相对亲缘关系。

核酸杂交和 DNA 印迹

DNA 片段可以从凝胶中纯化出来，用于多种研究，包括核酸分子杂交，简写成杂交（hybridization）。回顾 7.2 节，当 DNA 变性的时候，具有互补碱基序列的另外的一个单链 DNA（或 RNA）分子可与之形成杂交分子，后者称为核酸探针简称探针（probe）。

核酸分子杂交对于从不同遗传因子中发现相似序列或发现特异的基因区域是非常有用的。

人们已经掌握了用杂交探针与通过凝胶电泳分离出 DNA 片段的杂交技术。一个非常通用的技术是 DNA 印迹（Southern blot），它是用发明者的名字 E. M. Southern 来命名的。

DNA 印迹是将凝胶中的 DNA 片段转移到膜上，变性形成单链，然后用标记的探针加到膜上，进行杂交。如果探针与任何一个 DNA 片段是互补的，就形成了杂交分子。通过检验结合在膜上的标记，就能够测定杂交。通过放射性物质来制作探针，或者

通过用生成有颜色物质的试剂或用荧光物质来标记探针。杂交过程中，当凝胶中是DNA而探针是RNA或DNA时，称为Southern blot。通过对比，当凝胶中是RNA时，而探针是DNA或RNA时，该过程称为Northern blot。图7.24给出的是，如何利用Southern blot来确定含有与探针杂交序列的片段。

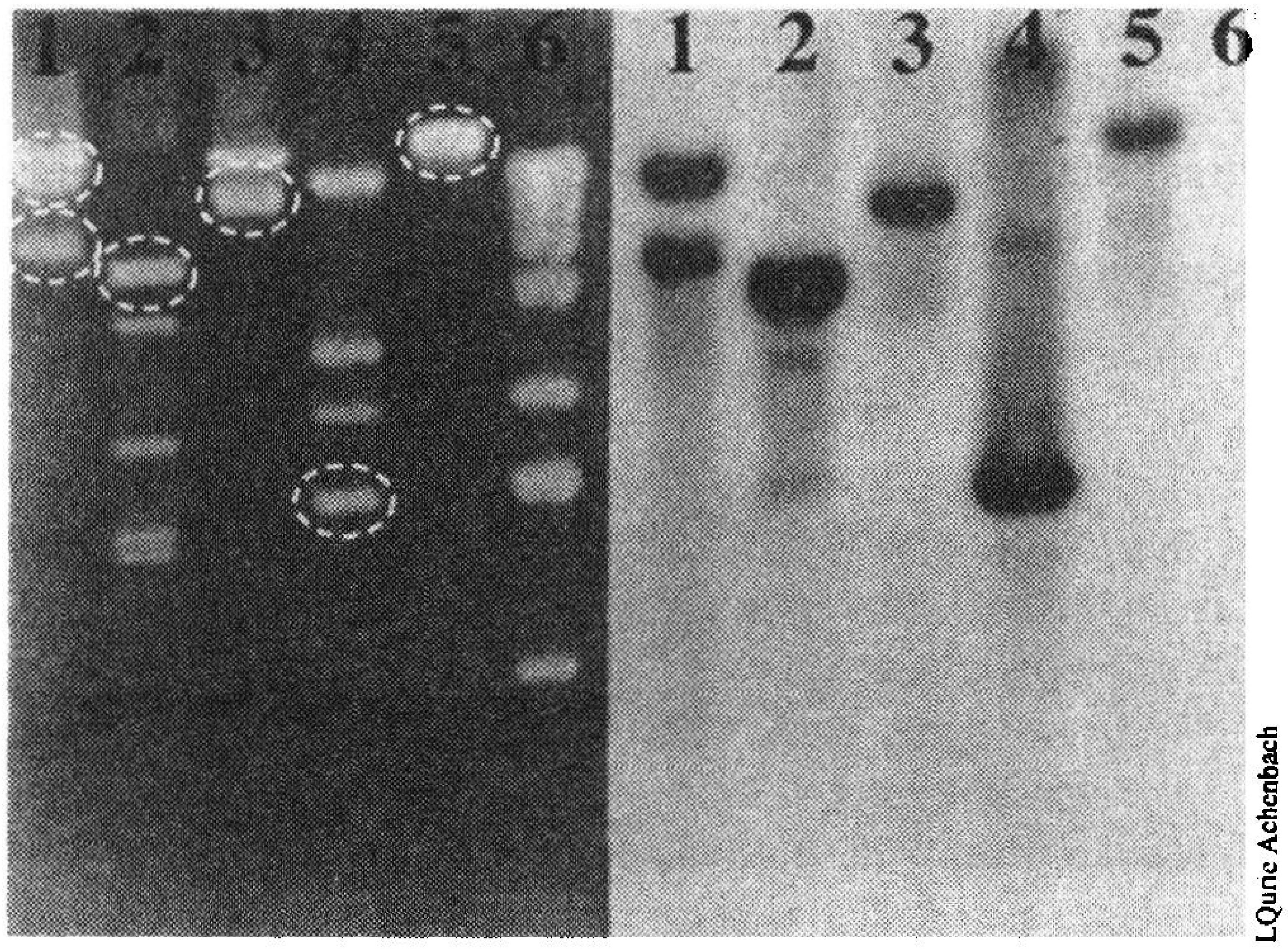


图7.24 Southern blot。左边的带型是DNA分子的琼脂糖凝胶电泳。它是分离纯化的若干不同质粒DNA分子经限制酶处理后进行凝胶电泳的结果。右边带型是左边看到的DNA胶的Southern blot。杂交后，杂交结果通过放射性标记探针检测。通过X射线放射自显影确定结合位置。注意，只有圈出的一些DNA片段才与标记的探针碱基序列互补。6泳道DNA是DNA分子质量大小标准，没有一个带与探针杂交。

概念检查

限制酶在DNA中识别特异序列并切开DNA。限制酶消化的产物利用凝胶电泳可以分离开，并通过杂交确定互补序列。

◆ 为什么限制酶对基因操作是有用的？

◆ 什么是Southern blot，它说明了什么？

7.8 DNA测序与DNA合成

除了限制酶和杂交分析DNA外，另一个常用的分析DNA的方法是测序（sequencing），即测定DNA中的核苷酸排列顺序。为了用于测序和杂交研究，我们可以合成已确定的核苷酸序列作为引物与探针。这种短的DNA片段（10～20个核苷酸）称为寡核苷酸（oligonueleotide）。随着限制酶的应用（见7.7节），核苷酸测序对于分子生物学是一个关键性的工具，在此我们讲述基本的测序过程。

DNA 测序

如今的大部分 DNA 序列是利用 Sanger 双脱氧的方法完成的。此法是通过一些方法标记 4 种碱基，如用放射性物质，然后以每一种碱基终止 DNA 片段。这些片段进行凝胶电泳，在长度上只有一个核苷酸差别的片段能在凝胶上被分离开。这个操作方法需要 4 个独立的反应（4 个独立的凝胶泳道），对每一个序列进行测定。DNA 片段会在 4 种碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶）的每一个碱基上终止。通过放射自显影（或荧光探针）找出片段的位置，就可以读出 DNA 序列。

Sanger 双脱氧方法是利用 DNA 聚合酶，以单链 DNA 为模板形成一个拷贝的过程。正如我们前面看到的，此酶利用脱氧核苷三磷酸作为底物加入到引物上（见 7.6 节），在每一种反应体系中（4 个独立的试管），除 4 种脱氧核苷三磷酸外，还有其中一种的双脱氧类似物（图 7.25）。由于双脱氧的糖缺少了 3′-OH，所以下一个核苷酸就不能继续加入进去，使 DNA 链不能继续延伸。双脱氧类似物作为特异性链的末端终止剂发挥作用。要获得各种不同长度的寡核苷酸片段，要控制好反应体系条件。对这些片段进行电泳，用 X 射线自显影或通过荧光测定，来确定 4 种双脱氧核苷酸泳道的排列次序和每一个片段与它邻近的片段带的位置对应关系的图谱，最终就可以从凝胶上直接读出 DNA 序列（图 7.26）。

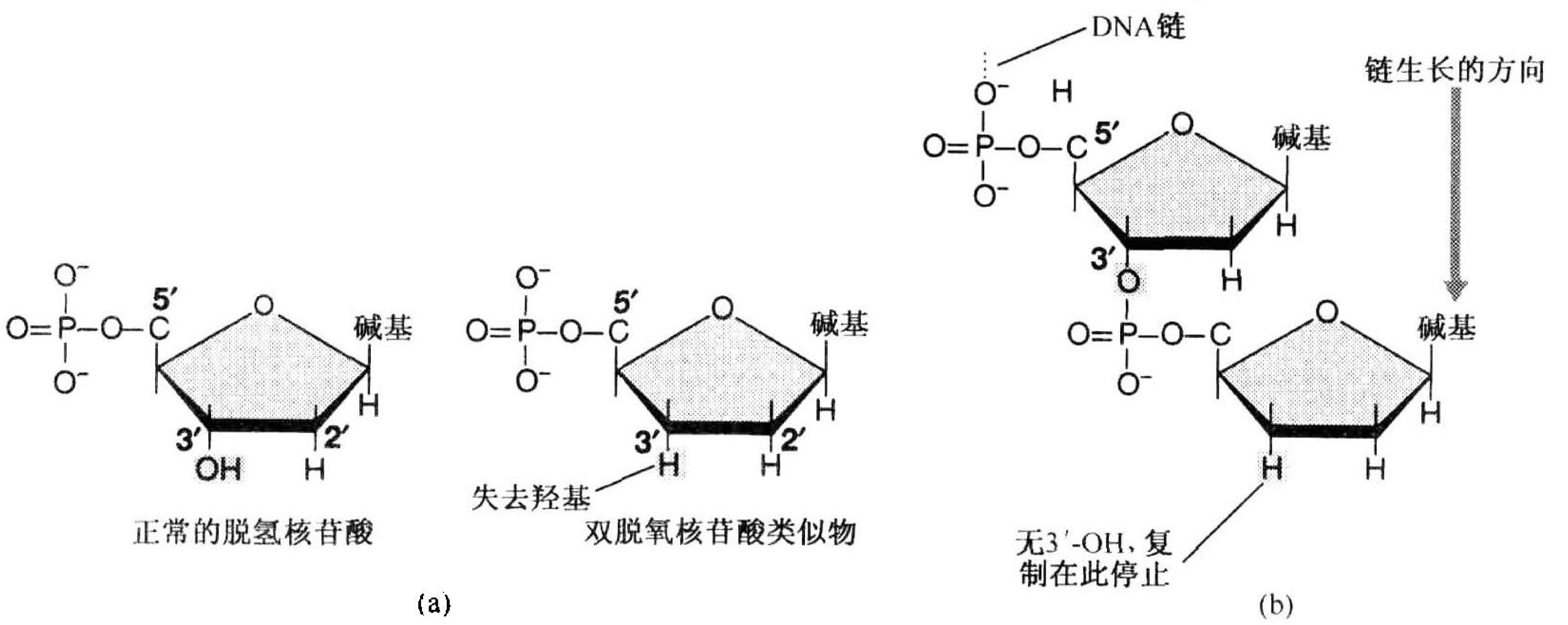


图 7.25　双脱氧核苷酸和 Sanger 测序。（a）正常的双脱氧核苷酸在 3′碳上有羟基，而双脱氧核苷酸没有。（b）双脱氧核苷酸结合之后发生链终止作用。将此图与图 7.12 对比。

RNA 测序和自动测序

Sanger 方法不仅用于 DNA 测序而且还用于 RNA 测序。RNA 测序首先是合成一个单链的 DNA（用 RNA 为模板），催化此反应的酶是从某些病毒中发现的，称为反转录酶（reverse transcriptase）（见 9.13 节）。在双脱氧核苷酸参与下合成的单链 DNA 形成各种不同长度的 DNA 片段以适合于 Sanger 测序。

由于大规模的测序任务的需要（第 15 章和第 31 章）发展了自动 DNA 测序系统。用此系统测序反应仍然是基于双脱氧方法，但是用荧光物质代替了放射性物质来标记引

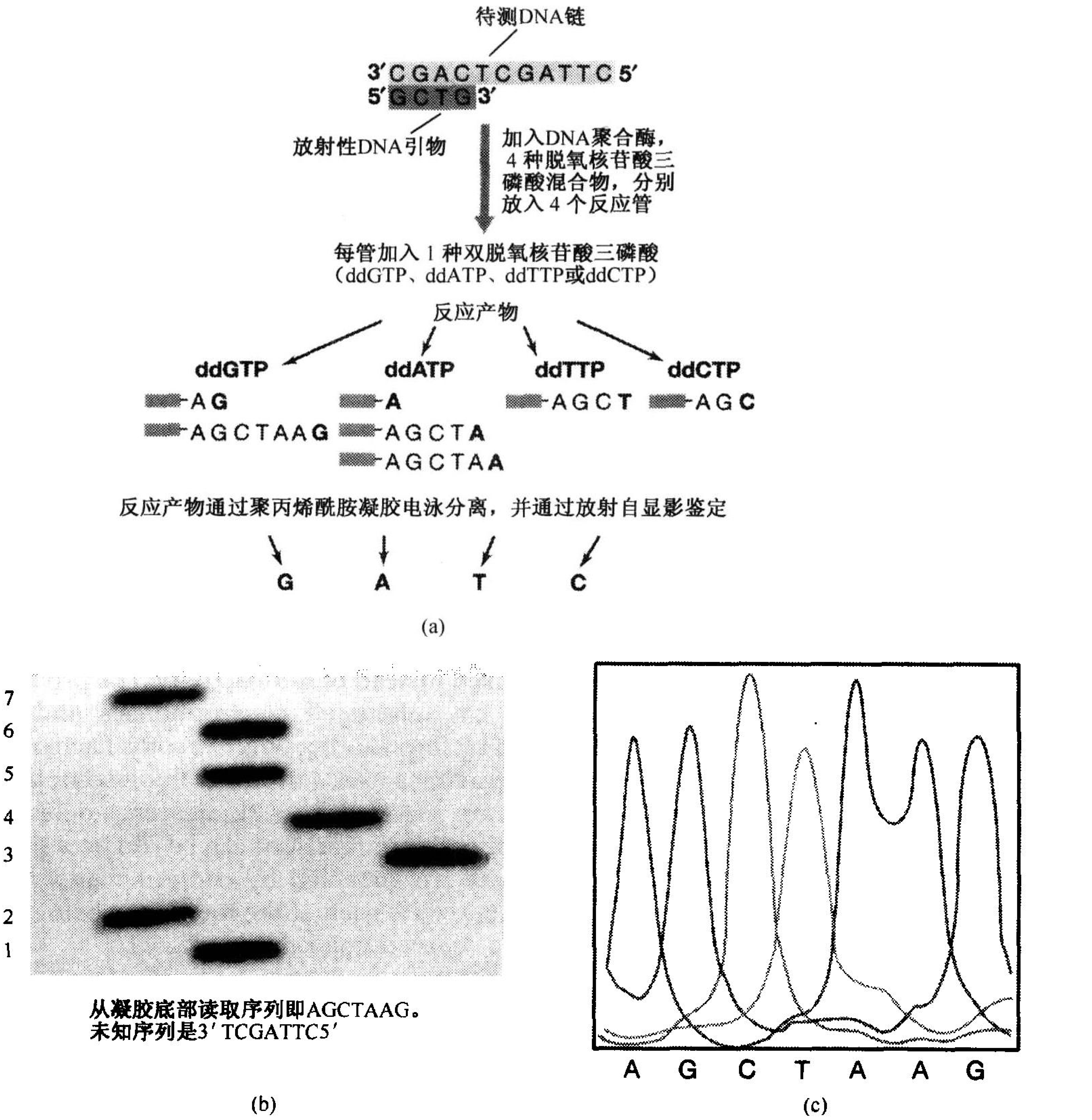


图 7.26 用 Sanger 法进行 DNA 测序。（a）模板 DNA 链是被测序的 DNA。注意用每一种双脱氧核苷酸进行 4 种不同的反应。为了方便在体外进行这些反应，对于 DNA 合成所需的引物不是 RNA，而是用 DNA。（b）凝胶的一部分，它包含了来自（a）的反应产物。（c）被测 DNA 链的结果与（a）和（b）中所使用的 DNA 相同，但使用了一个自动测序仪和荧光标记探针。

物（或核苷酸）。通过自动电泳分离产物，用荧光显微镜测定电泳带。4 种不同反应的每一种使用不同的荧光标记。通过测定荧光的激光器扫描电泳带。在这个方法中，所有的 4 种反应产物可以在一个泳道中同时进行电泳。通过计算机分析结果，用各自的颜色区分 4 种碱基的每一种，最终就可以确定出一个 DNA 序列（图 7.26c）。

合成 DNA

合成 DNA（synthetic DNA）的操作过程完全是自动化的，所以 30～35 个碱基的寡核苷酸在几个小时内很容易合成，而且长度在 100 个碱基以上的寡核苷酸片段，如果

需要也能合成。较长的多聚核苷酸可以通过这样短的核苷酸片段利用 DNA 连接酶（见 7.6 节）催化连接而成。

在体外可以通过固相生产方式（solid-phase procedure）合成 DNA，在此方法中，链的第一个核苷酸牢牢结合在一个不溶解的渗透性的支持物上（如颗粒大约 50μm 大小的硅胶）。总体过程如图 7.27 所示。每个核苷酸的加入都需要几个步骤，但发生的化学反应不需要我们干预，每一个步骤完成之后，反应混合物就从固相的支持物上洗下来，然后再加入下一个核苷酸，重复进行一系列的反应。一旦达到了需要的长度，用特殊的试剂将寡核苷酸从固相支持物上切下来。并进行纯化去除副产品和污染物。

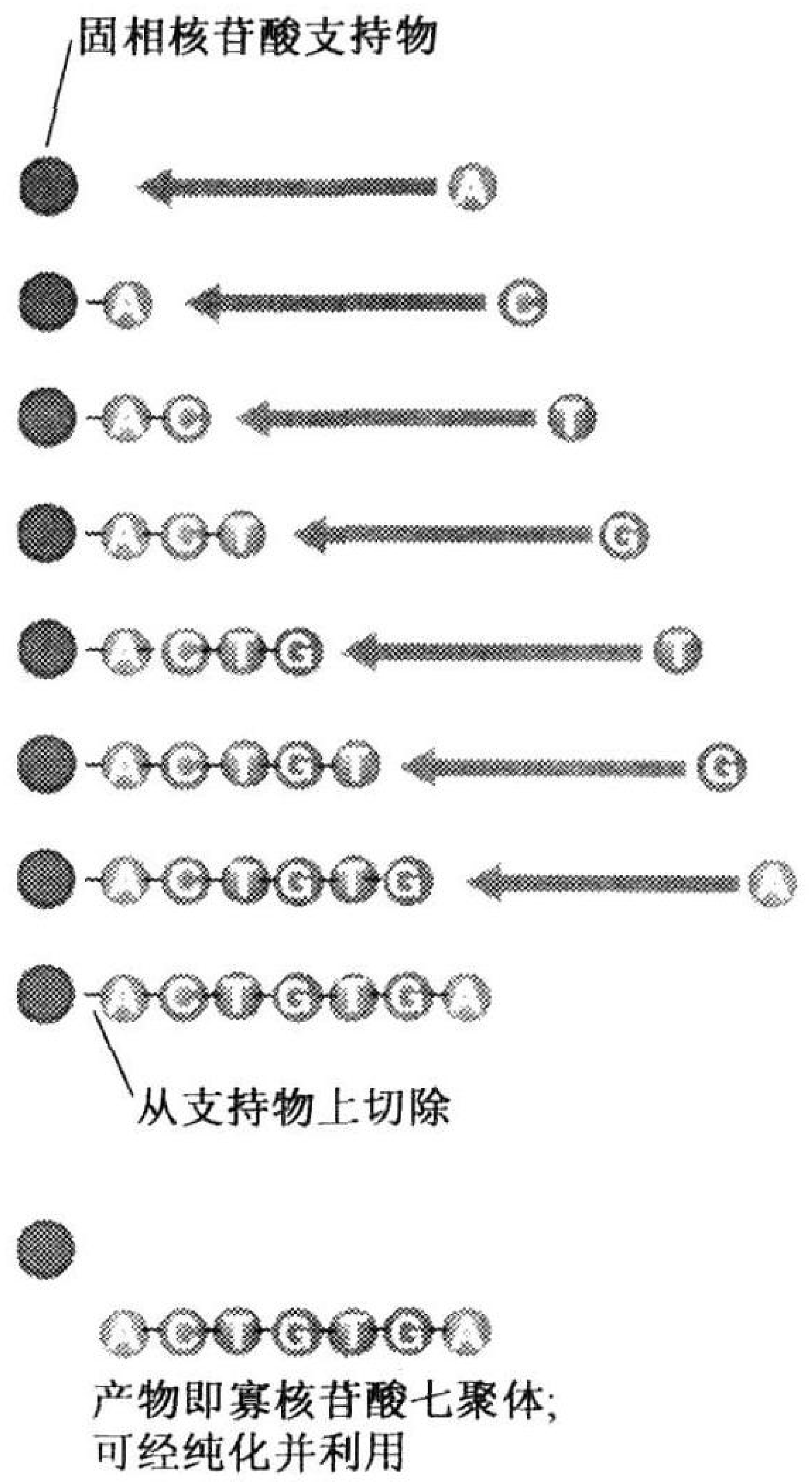


图 7.27　为合成特定序列 DNA 片段所用的固相支持物。 在生长的链上加入 1 个核苷酸的化学合成过程。

合成的 DNA 分子广泛应用于各种目的，除了作为 DNA 测序的引物外，还可以作为聚合酶链反应的引物（见 7.9 节）。还能分别用于 Southern blot 或 Northen blot 的 DNA 或 RNA 探针，用于核苷酸杂交（图 7.24）。我们后面讨论（见 10.18 节）合成的 DNA 如何用于称为基因定向位点突变（site-directed mutagenesis）的过程，这种方法可以用于构建出在特定区域突变的基因。

概念检查

用 Sanger 法可用于 DNA 测序，此法涉及 DNA 的特别反应，并在此反应体系中加有终止反应的双脱氧核糖核苷酸，用凝胶电泳进行终产物的分离，并完成读取序列。

- ◆ 在 DNA 测序的方法中，为什么使用 4 种不同反应？
- ◆ 含有数个核苷酸的核酸分子用什么术语来描述？

7.9　DNA 扩增：聚合酶链反应

随着 DNA 合成和 DNA 测序的发展产生了一项新的技术，能在体外迅速扩增 DNA，那就是聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）。聚合酶链反应能在试管中扩增 DNA 分子高达数亿倍，为分子生物学实验制备大量的特异基因。PCR 用 DNA 聚合酶拷贝 DNA 分子（见 7.6 节）。

PCR 扩增 DNA 的步骤概括如下：①用寡核苷酸合成仪合成靶 DNA 的两个 DNA 寡核苷酸引物（图 7.28a），并且向热变性靶 DNA 中过量加入；②当混合物冷却时，过量的与靶 DNA 相关的引物保证大部分靶链与引物退火配对，而不是自身相互配对；③然后 DNA 聚合酶作用，以靶链为模板延伸引物（图 7.28b）；④运行一个周期之后，

混合物被再次加热，双链分开。然后冷却，引物与新合成的 DNA 互补杂交，整个过程再次重复（图 7.28c）。

PCR 的奥秘是一个引物延伸的产物，又作为下一个循环的模板（图 7.28)，确实 PCR 技术的妙处在于每一个循环之后，原始靶 DNA 的量就加倍。在实践中，常用 20～30 个循环，产生 10^6～10^9倍靶序列的量（图 7.28d)。

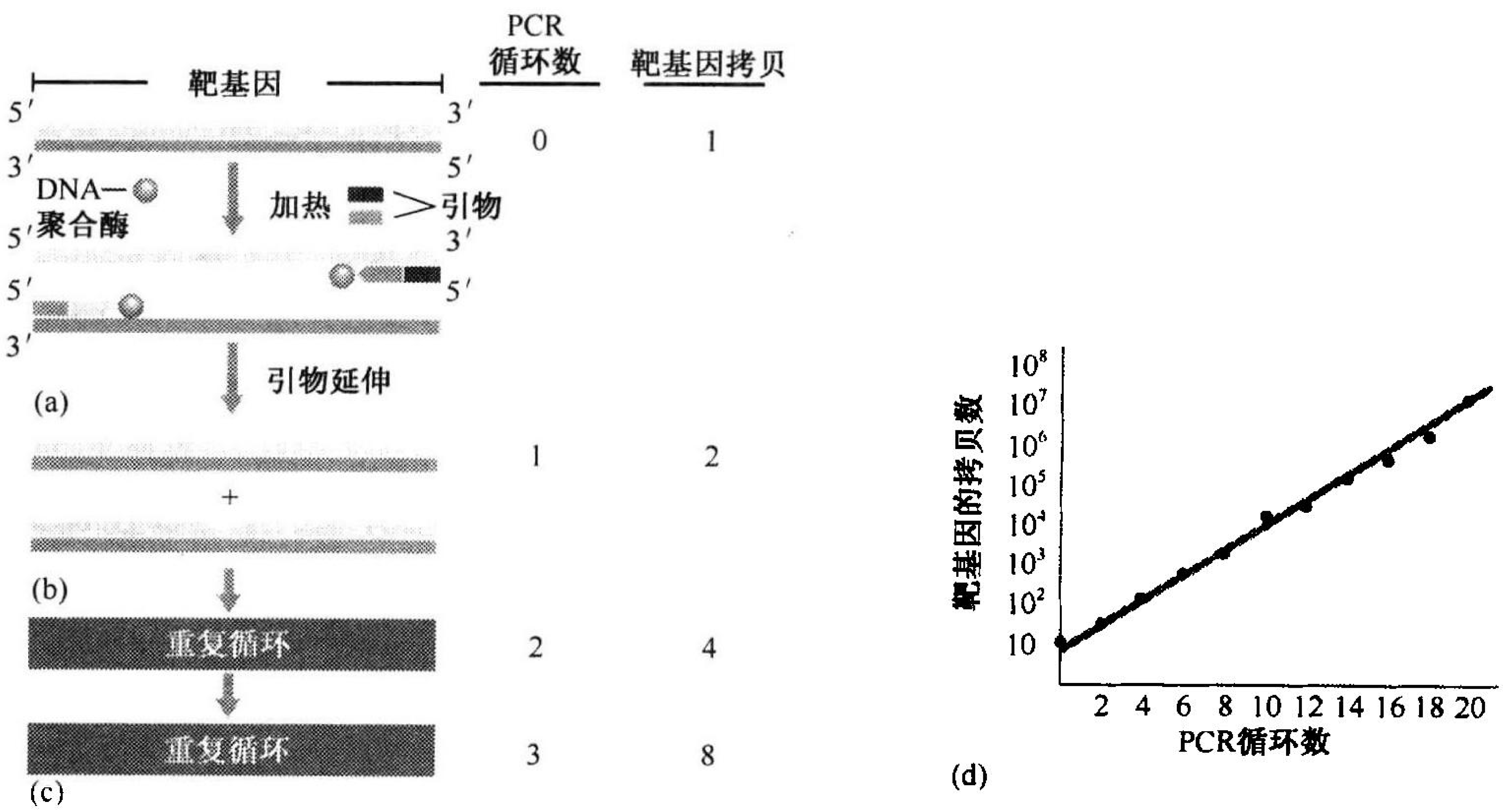


图 7.28 聚合酶链反应（PCR）扩增特异的 DNA 序列。（a）靶 DNA 加热后，两条链分开，超量的两种寡核苷酸引物与靶链互补，随着 DNA 聚合酶的作用形成互补链。(b）随着引物的退火，引物延伸，形成原始的双链 DNA。(c）多加两个 PCR 循环分别产生 4 个和 8 个基因拷贝。(d）原始含有 10 个拷贝的靶基因经过 20 个 PCR 循环后的 DNA 制备物的效果图。此图是半对数坐标图（图 6.6)。

高温 PCR

最初 PCR 技术使用 *E. coli.* Pol Ⅲ。但是需要高温使 DNA 双链模板变性，因此酶也变性，每轮加热后，必须补充酶。通过使用热稳定 DNA 聚合酶，才解决了酶也变性的问题。此酶是从生活在热泉环境的细菌水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）中分离出来的 DNA 聚合酶，称为 *Taq* DNA 聚合酶（*Taq* polymerase)。在 95℃也是稳定的。因此，在 PCR 反应中进行热变性步骤时也不受影响，*Taq* DNA 聚合酶的应用还提高了 PCR 反应的特异性。因为 DNA 合成延伸是在 72℃而不是 37℃。在高温时，引物与非靶 DNA 的非特异性杂交体发生率很低。所以用 *Taq* PCR 获得的产物基因同源性比 *E. coli*的酶更高。

从极端嗜热的激烈火热球菌（*Pyrococcus furiosus*）（生长的热环境是 100℃）（见 6.12 和 13.6 节）中分离的 DNA 聚合酶，称为 *Pfu* 聚合酶（或者 "vent 聚合酶"，因为 *P. furiosus* 是从极热的火山口分离到的，见 19.8 节），此酶也广泛应用，甚至比 *Taq* 聚合酶更加热稳定。然而，*Pfu* 聚合酶不像 *Taq* 聚合酶，它还有一种校正活性（见 7.6 节)，当需要更精确的时候，使用它是一个特别好的酶。

由于在 PCR 过程中，要有大量的重复步骤，PCR 仪称为热循环仪，它可以自动地加热和冷却。由于一个循环大约需要 5min，经自动仪合成扩增 DNA 大量产物仅需几小时。为了供应 PCR 中所需求的热稳定 DNA 聚合酶及 DNA 测序市场的需求。这些酶的基因已经克隆到 *E. coli* 中，已经大规模生产实现了商品化，因此，现在做一次 PCR 反应的成本与原来相比，已经显得微不足道了。

PCR 的应用及其灵敏性

PCR 是一个有力的工具，它容易操作，非常灵敏和特异，而且有效。扩增时每一个循环产物量就加倍，导致所需 DNA 以指数增长（图 7.28），这就是说，在几个小时内不仅 DNA 大量扩增，而且在开始的反应样品中所需要的靶 DNA 分子很少。反应是特异的，15 个核苷酸左右的引物，在高的退火温度下，几乎没有“错误引发”出现。因此 PCR 产物实质上是同源的。

PCR 对于克隆基因的获得或测序是非常有价值的。因为如果已知基因的两端序列或插入基因序列，就很容易扩增。PCR 还常用于系统发育研究和比较，可以对从不同来源的基因进行扩增。在这些情况下，针对各个区域不同的生物所保守的基因区域合成引物。例如，16S rRNA 用于系统发育的分析（见 2.3 节），它既有很高的保守区，又有高度的可变区域，来自于细菌或古生菌的 16 S rRNA 基因的特异性引物被合成，用来考察微生物在一个生境中每一个属各种的现象特征。

如果使用更加特异的引物，就可以针对特定亚群中一些基因区域进行扩增。此技术广泛用于微生物生态学并揭示出微生物世界庞大的多样性。因为目前我们对大部分微生物仍然未鉴定出来（第 2、11～14、18 章）。

由于 PCR 是一项灵敏的技术，很小量的 DNA 它都能得到扩增。例如，PCR 能用于不同来源 DNA 的扩增和克隆，像保存下来的木乃伊、化石动植物。PCR 还能够从细胞的混合物中扩增和分析 DNA，它是鉴别微生物的通用工具。例如，如果一个临床样品显示出个别病原菌特异基因的存在，我们就可以推断此样品中存在着此病原菌。根据此信息，就可以对患者开始进行治疗（见 24.12 节）。因此，PCR 可以减少培养微生物的过程，避免浪费和无用功。PCR 还用于 DNA 指纹分析，作为一项有力的法庭工具，通过很少量的 DNA 样品（第 31 章）就可以鉴定出个体之间的关系。PCR 与 DNA 的反转录结合就有了 RT-PCR。当需要以 RNA 为模板制备大量 DNA 时，RT-PCR 是非常有用的。

概念检查

聚合酶链反应是在体外扩增 DNA 的过程。使用的热稳定 DNA 聚合酶是来自于嗜热的原核生物。加热使 DNA 变性，使其形成两条单链，每一条链通过聚合酶进行复制。每一个循环之后，新形成的双链通过加热再次分开，继续一个新的复制过程。在每一次循环中，靶 DNA 的量加倍。

◆ 为什么 PCR 需要引物?

◆ 所使用的引物为什么在 DNA 的每一端进行扩增?

V RNA 的合成：转录

核糖核酸（RNA）在细胞中具有许多重要功能，在化学性质方面，RNA 和 DNA 有三点区别：①RNA 含有核糖，而不是脱氧核糖；②RNA 碱基中尿嘧啶代替了胸腺嘧啶；③除了某些病毒，RNA 没有双链。由脱氧核糖变成核糖会影响核酸的一些化学特性，一般作用于 DNA 的酶不作用于 RNA，反之亦然。由胸腺嘧啶变成尿嘧啶不影响碱基配对，因为这两个碱基均与腺嘌呤配对。

RNA 的三个主要类型是：信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、转运 RNA（transfer RNA，tRNA）、核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）。这些类型的 RNA 都是 DNA 转录的产物。需着重强调的是 RNA 在遗传和功能两个方面的作用。在遗传方面，RNA 能够携带来自 DNA 的遗传信息（mRNA）（或在 RNA 病毒中，直接起遗传信息的作用）。作为大分子，RNA 在核糖体（rRNA）的功能和结构方面发挥作用，或作为蛋白质合成中氨基酸的转移工具（tRNA）。一些 RNA 有催化（酶的）活性，在这节中，主要讨论怎样合成 RNA。

7.10 转录的概述

从 DNA 到 RNA 遗传信息的转录由 RNA 聚合酶（RNA polymerase）完成，RNA 聚合酶类似于 DNA 聚合酶，但它催化核糖核苷酸而不是脱氧核糖核苷酸之间磷酸二酯键的形成。RNA 聚合酶需要 DNA 作为模板。RNA 的前体物是核糖核苷三磷酸，即 ATP、GTP、UTP 和 CTP。

RNA 的化学合成更像 DNA 的化学合成（图 7.12）。在 RNA 链的延伸过程中，核糖核苷三磷酸加到前一个核苷酸的核糖 3′-OH 上，伴随两个高能磷酸键的打开，形成多聚物。因此像 DNA 合成一样，在 RNA 的合成中，链生长的总体方向是从 5′端到 3′端，模板链相对新合成的链是反向平行的。然而，RNA 聚合酶不像 DNA 聚合酶，它不需要引物就能够开始新链合成。

RNA 聚合酶

RNA 聚合酶催化的反应中，模板 DNA 是双链 DNA 分子，对于任何已知基因来说，仅以其中一条链为模板进行转录。虽然如此，基因在任何一条链中都存在。所以在转录过程中，两条链的某些区域在不同的时间被转录。

虽然所有生物体的 RNA 聚合酶都符合这一规则，但是 RNA 聚合酶在细菌、古生菌和真核生物中有明显的区别。在细菌和古生菌中，它们都含有单一的 RNA 聚合酶，在真核生物的细胞核中含有 3 种这样的酶：RNA 聚合酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ，每一种都参与不同类型的基因转录。所有来源的 RNA 聚合酶都含有一些进化上保守的亚单位（图 11.16）。然而，根据系统发育，古生菌和真核生物 RNA 聚合酶更相似，它们在结构上比细菌 RNA 聚合酶更加复杂。下面只详细讨论细菌的 RNA 聚合酶，其结构最简单，同时了解得也最清楚。

从细菌中分离到的所有 RNA 聚合酶都是密切相关的蛋白质。来自大肠杆菌的酶有

4 个不同类型的亚基，称为 β、β′、α 和 σ，α 存在两个亚基。亚基之间相互作用形成有活性的酶，该酶称为 RNA 聚合酶全酶（RNA polymerase holoenzyme）。但是 σ 因子并不像其他亚基那样紧密结合，它很容易解离，从而导致核心酶（RNA polymerase core enzyme，$\alpha_2\beta\beta'$）的形成。核心酶单独作用能催化 RNA 的形成，而 σ 因子的作用是在 DNA 上识别适当的位点以便起始 RNA 合成。图 7.29 中绘出 RNA 的合成过程，包括 RNA 聚合酶和 σ 因子的参与。

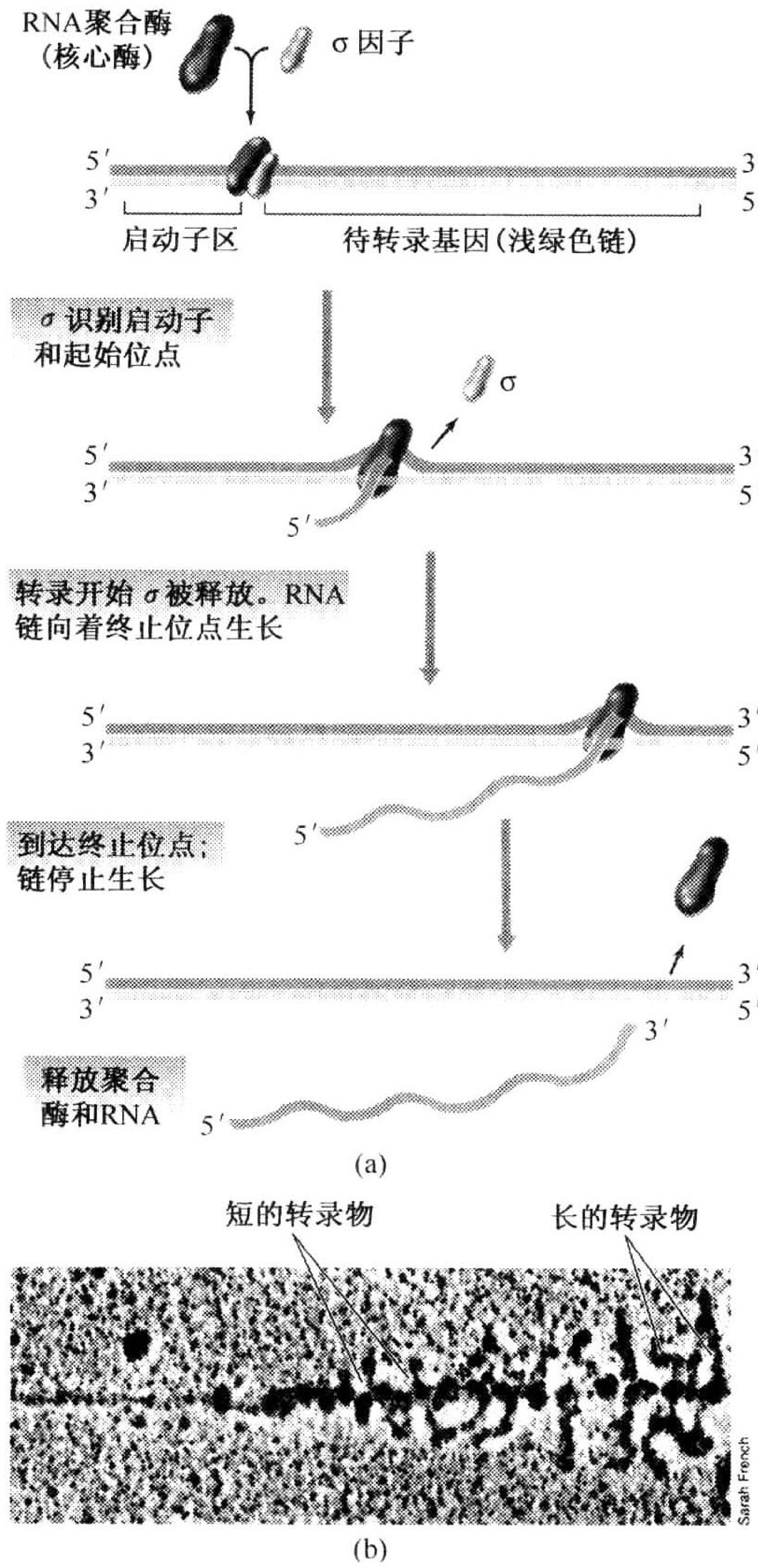


图 7.29　转录。（a）RNA 合成步骤。起始位点和终止位点是 DNA 上特殊的核苷酸序列。σ 因子协助 RNA 聚合酶识别起始位点启动子，σ 因子在延伸过程中被释放。RNA 聚合酶在 DNA 链上向下游移动，引起双链螺旋的暂时打开并以 DNA 的一条链为模板转录。当到达终止位点时，链的生长停止，mRNA 和聚合酶解离。（b）在大肠杆菌染色体上沿着一个基因发生转录的电子显微镜照片。转录活性的区域呈现大约 2kb。转录过程是从左到右进行的。左边较短的转录物，随着转录的进行而变长。

启动子

RNA 聚合酶是一个大型蛋白质，与 DNA 接触的同时覆盖了许多碱基对。类似于 RNA 聚合酶的蛋白质能与 DNA 特异地相互作用，这是由于暴露在大沟里的部分碱基对所致（图 7.5）。但是，为了正确地开始合成 RNA 链，RNA 聚合酶首先必须识别 DNA 上的适当区域。DNA 上的这些重要的位置，称为启动子（promoter）。

RNA 聚合酶一旦结合启动子，转录过程就将进行。在合成中，DNA 双螺旋在启动子的位置被 RNA 聚合酶打开（图 7.29）。随着 RNA 聚合酶移动，会引起 DNA 一个小短链的解旋。由于短暂解旋导致模板链碱基的暴露，因此能拷贝出互补的 RNA。可以将启动子看作是沿着 DNA 以一个方向或另一个方向指导着 RNA 聚合酶进行转录。当 DNA 上有两个邻近的启动位点以相反的方向起始时，那么以一个方向（在一条链上）从一个启动子开始转录，以相反方向（在另一条链上）从另一个启动子开始转录。

一旦形成了一小段 RNA，σ 因子就解离。RNA 的延伸是由核心酶单独进行的（图 7.29）。因此，σ 因子只在启动子处参与最初 RNA 聚合酶与 DNA 形成复合体的过程。随着新合成的 RNA 从 DNA 上解离，解开的 DNA 又恢复成最初的双螺旋状态。转录停止在特殊的区域，此区域称为转录终止子（transcription terminator）（见 7.12 节）。

因此，转录并不像 DNA 复制那样涉及拷贝完整的基因组，转录通常涉及 DNA 更小的单位，常常是一个基因。这种体系可以使细胞根据所需蛋白质的不同，以不同的频率转录出不同的基因。正如我们将在第 8 章要学到的，原核细胞中基因的转录调节是一个由许多机制组成的重要而精细的过程，同时也很有效地控制基因表达以及保存了细胞资源。

概念检查

RNA 三个主要类型是：信使 RNA（mRNA）、转运 RNA（tRNA）和核糖体 RNA（rRNA）。DNA 转录成 RNA 由 RNA 聚合酶催化，此酶将碱基加到生长链的 3′端。RNA 聚合酶不像 DNA 聚合酶，它不需要引物，并且能识别 DNA 上称为启动子的特殊起始位点。

◆ 转录沿着模板的哪一个方向（5′→3′或 3′→5′）进行？

◆ 什么是启动子？

7.11　σ 因子的多样性、共有序列和其他 RNA 聚合酶

正如我们注意到的那样，启动子在转录中起着核心作用。启动子是与 RNA 结合的特殊 DNA 序列。来自不同微生物的大量启动子序列已完成测序，图 7.30 所示是大肠杆菌中一些启动子的序列。正是 σ 因子，作为 RNA 聚合酶的一部分，主要参与识别这些启动子。

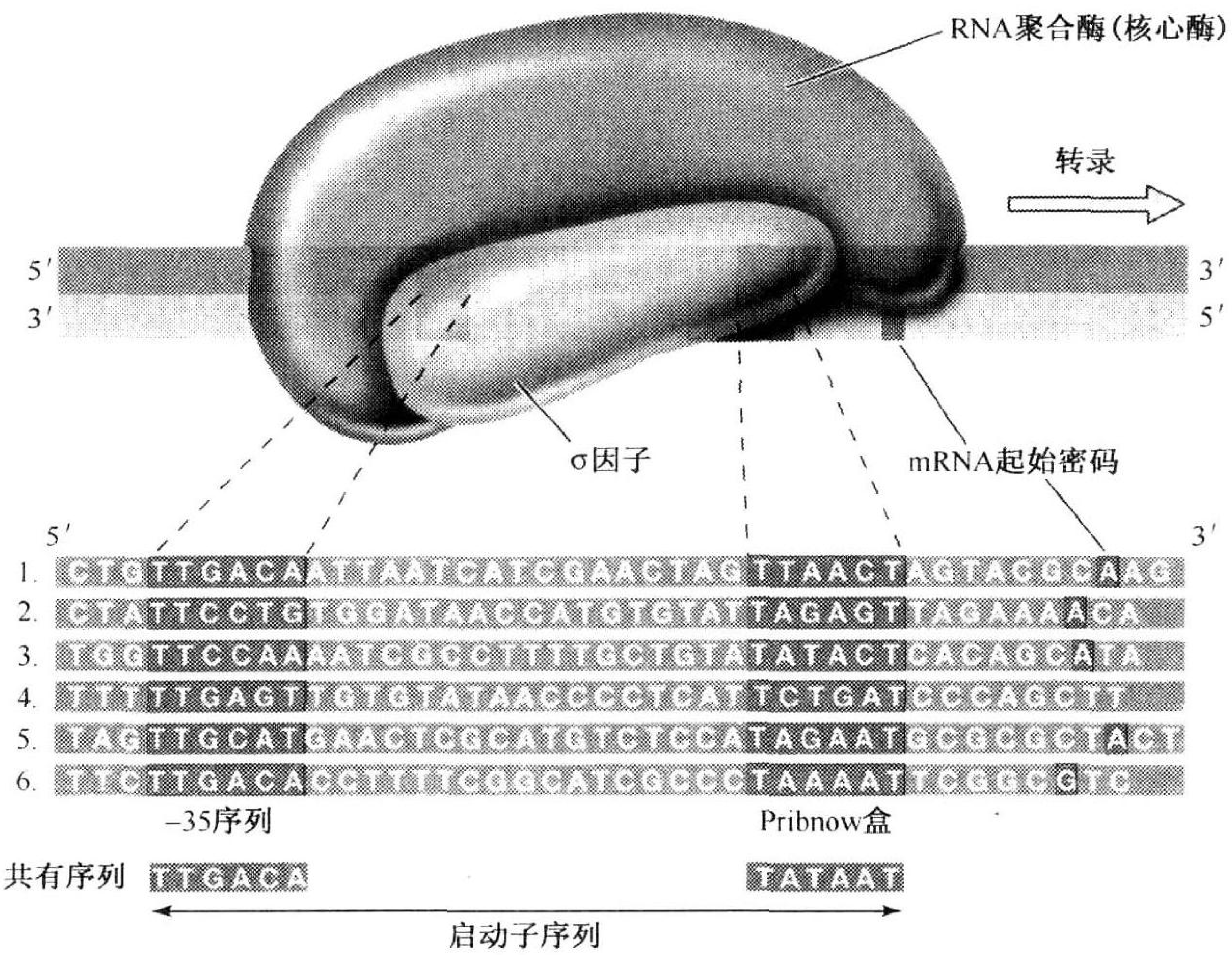


图 7.30　RNA 聚合酶与启动子相互作用。图示下面给出的是大肠杆菌中测定出的 6 个不同的启动子序列。图中显示出 RNA 聚合酶与 −35 序列和 Pribnow box 区（−10 序列）相互作用的位置。转录的开始正好在 Pribnow box 序列下游一个特异的碱基上。下面 −35 序列和 Pribnow box 区是从许多启动子的序列比较后得出的共有序列。注意启动子序列在 DNA 的 5′→3′链上（深绿色），但实际上是浅绿色的 3′→5′链被转录，因为 RNA 聚合酶只能以 5′→3′方向行使功能。

σ 因子的多样性

一个微生物能够合成若干不同的 σ 因子。例如，大肠杆菌（*Escherichia coli*）基因组，编码 7 个不同的 σ 因子，而枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）基因组编码 14 个不同的 σ 因子。这些可选择的 σ 因子使 RNA 聚合酶识别不同的启动子序列。虽然在已知的微生物中，一个单个的 σ 因子典型地参与了大量基因的转录，但是，那些特殊的或很少用到功能的基因可能需要不同的 σ 因子。当然，这也是控制此类基因表达的一种方法。假如一个需要的 σ 因子不存在，那么，需要该因子的基因就会有效地“关闭”。

图 7.30 中的所有 DNA 序列，是由同样的 σ 因子识别的，即大肠杆菌的主要 σ 因子，称为 σ^{70}。假如你细致观察这些序列，会发现它们并不是完全相同的。然而，在启动子区域中，有两个序列是高度保守的，而被 σ 因子识别出的正是这两个区域。这两个序列位于转录起始位点之前（上游）。其中一个位于转录起始点上游 10 个碱基的位置，也就是 −10 区（称 Pribnow box）。尽管每个启动子 −10 区有微小的区别，但大多数碱基是相同的。对 σ 识别的所有启动子的 −10 区进行比较并测定每个位点最常出现哪个碱基，得到的共同序列（consensus sequence）是 TATAAT。在我们的例子中，每一个启动子中都有 3～5 个这些碱基的组合。第二个共同序列是在离转录开始位置大约 35 个碱基处。在 −35 区的共同序列是 TTGACA（图 7.30）。同样的是启动子的大部分序列并不像共同序列那样完全一致，但是很相似。

值得注意的是，在图 7.30 中，只显示出一条 DNA 链中的启动子序列。按照习惯，给出的这条链 5′端为上游（因此，并不是 RNA 聚合酶用来作模板的链，图 7.30）。仅仅给出了一条链的序列是为了描述启动子的简单“速记”。启动子实际上是双链。也就是说，RNA 聚合酶所识别的和结合的是双链 DNA，虽然 RNA 转录时用的只是其中的一条链或者另一条链为模板。

在其他的生物中，σ 因子结合的序列有时比图 7.30 中的 σ^{70} 特异性更强。此时在所识别的关键的碱基中只允许有很小的误差。在大肠杆菌中，更像共有序列的启动子通常在结合 RNA 聚合酶时更有效。这些更有效的启动子称之强启动子，它们在遗传工程中是很有价值的，这些内容将在第 31 章中讨论。

真核生物和古生菌中的 RNA 聚合酶

真核生物中在细胞核里有 3 种不同类型的 RNA 聚合酶，每一种酶都识别一种与某一类基因相关联的启动子。RNA 聚合酶Ⅰ合成几乎所有类型的 rRNA，RNA 聚合酶Ⅱ合成所有的 mRNA，RNA 聚合酶Ⅲ合成 tRNA 和一种 rRNA。基于这种特殊原因，每一种类型的 RNA 聚合酶只能识别与某一类基因相关联的特殊启动子。相比之下，在细菌中编码蛋白质基因的启动子与编码 tRNA 基因的启动子能够完全相同。在真核生物中，为了识别特殊的启动子，RNA 聚合酶也需要辅助蛋白。但是，与细菌不同，这些真核中的起始因子（和古生菌中的起始因子）识别启动子元件是独立的，而不是作为聚合酶全酶的一部分（图 7.31）。

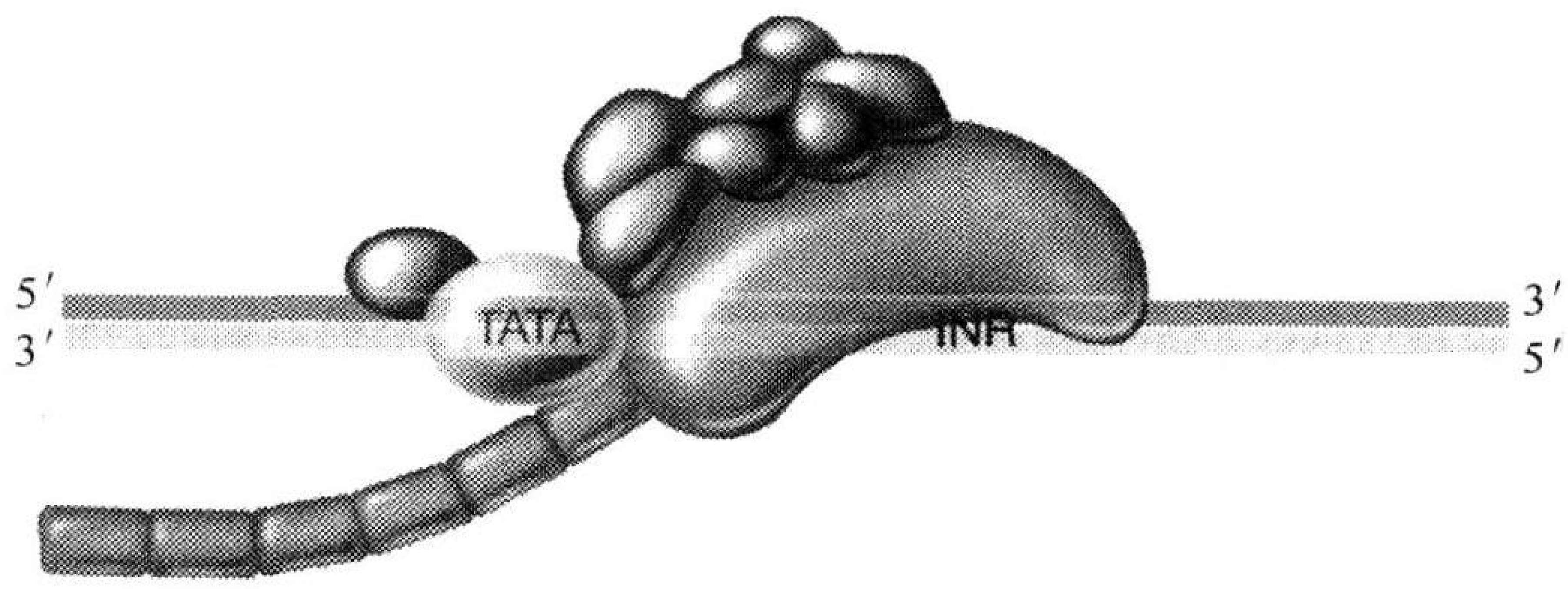


图 7.31 真核生物 RNA 聚合酶Ⅱ与启动子相互作用。 RNA 聚合酶本身（棕色）位于启动子的起始元件（INR）处，TATA 框结合蛋白（黄色）结合在 TATA 框上。聚合酶有一个重复的氨基酸序列末端（像尾巴结构），其磷酸化状态影响聚合酶活性。其他以蓝色表示的蛋白质代表真核生物转录起始所需要的许多辅助因子。

图 7.31 描述的是 RNA 聚合酶Ⅱ结合于启动子。这个特定的启动子含有一个 TATA框，此共有序列类似于细菌中的 Pribnow 框（图 7.30），它也是转录开始位点附近的一个起始元件。这两个区域是真核生物启动子的关键元件，许多其他的序列也可存在于某一启动子中。

在古生菌中，仅有一种 RNA 聚合酶，此酶更类似于真核生物的 RNA 聚合酶Ⅱ，启动子的结构也类似于真核生物的启动子。古生菌的启动子含有 6～8 个碱基对的 TATA框，位于转录起始位点上游 18～27 个核苷酸处。古生菌的转录也需要类似于真核生物转录中的一些附加因子（图 7.31）。因此，古生菌和真核生物（见 2.3 节）之间系统发育相关性也表现在转录过程中主要分子过程的几个细微之处。通过本书的后续部分，我们将了解更多有关古生菌与真核生物之间其他分子相关性的内容。

概念检查

在细菌中，RNA 聚合酶的 σ 亚单位识别启动子。由特异的 σ 因子识别的启动子具有很相似的序列。在真核细胞中，主要的几类 RNA 是由不同的 RNA 聚合酶转录的，如大部分 mRNA 都由 RNA 聚合酶Ⅱ产生。古生菌仅有的一种 RNA 聚合酶在结构和功能上类似于这种 RNA 聚合酶Ⅱ。

◆ 什么是共同序列?

◆ 在真核中，哪一类型的 RNA 聚合酶转录编码蛋白质的基因?

7.12 转录终止子

对于蛋白质合成的保真度来说，转录的终止像转录的起始一样重要。RNA 合成的终止（termination）在 DNA 的特定碱基序列上发生。

在细菌中，通常 DNA 上的终止序列是含有反向重复的序列，其中心有非重复的部分（见 7.2 节和图 7.6 对反向重复的解释）。当这样的 DNA 序列被转录时，RNA 通过链内碱基配对形成茎-环结构（图 7.32）。当这种 RNA 的茎-环结构后边排列一串尿嘧啶时，就是有效的转录终止子。其他序列特异的终止位点富含 GC 序列，后边紧随 AT 富集序列。这种结构无需任何外来因子加入就能导致终止，被称为内在终止子（intrinsic terminator）。

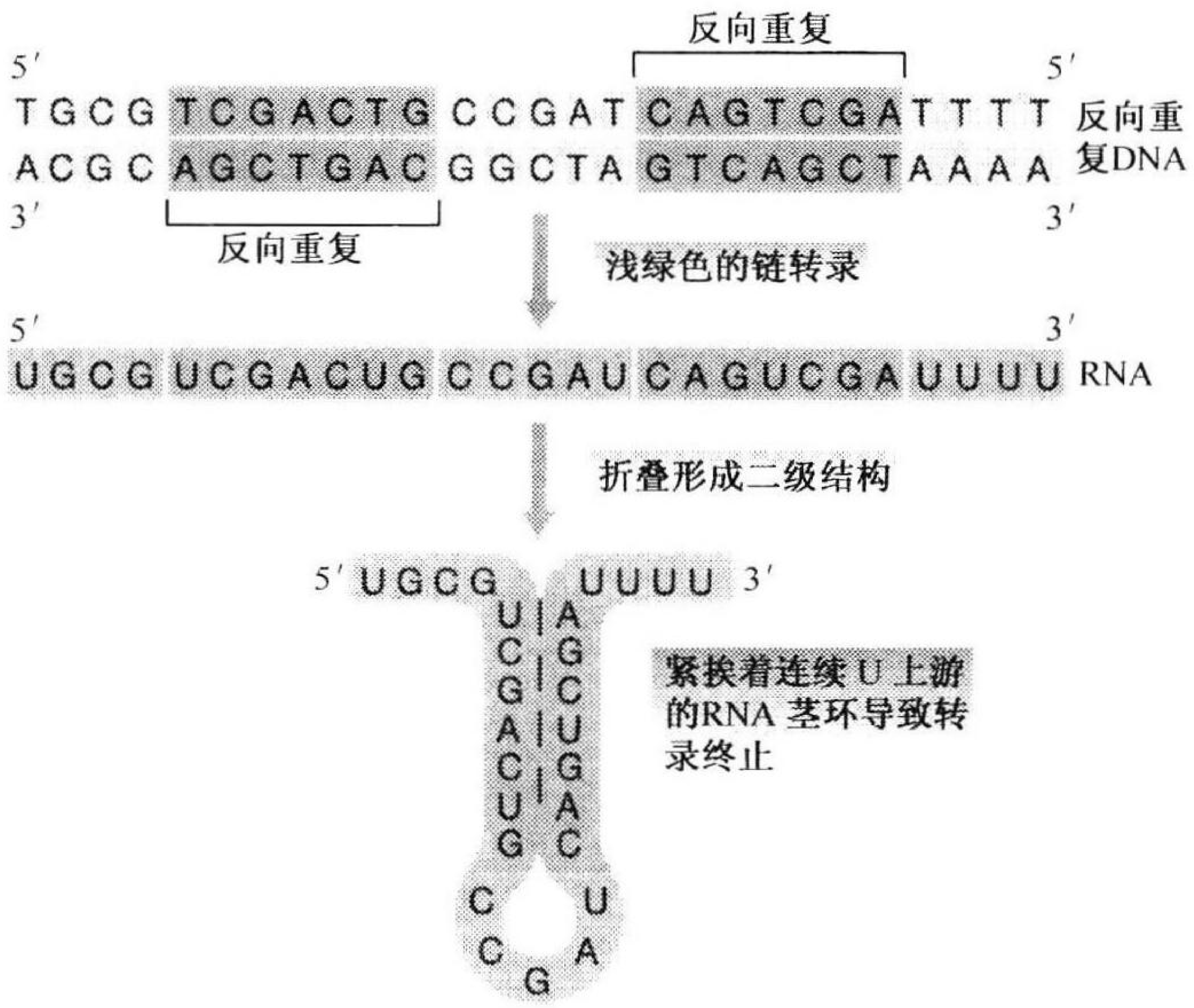


图 7.32　反向重复和转录终止。被转录的 DNA 中反向重复序列导致 RNA 茎-环结构的形成，这个结构能导致转录终止。

依赖于 ρ 因子的终止子

终止子的另一类型需要特异的蛋白质因子。在大肠杆菌中，一种类型的转录终止子需要称为 ρ（Rho）的蛋白质参与，ρ 不与 RNA 聚合酶和 DNA 结合，而与 RNA 紧密

结合并向着 RNA 聚合酶-DNA 复合体方向沿链移动。RNA 聚合酶一旦停止在依赖于 ρ 的终止位点，ρ 就会引起 RNA 和聚合酶脱离 DNA，因此导致转录终止。类似于 ρ，其他参与转录终止的蛋白质是一些 RNA 结合蛋白。在所有情况下，涉及终止作用的序列都是在 RNA 水平上起作用。然而，要记住 RNA 是由 DNA 转录的，因此，转录的终止最终由 DNA 上的特定核苷酸序列决定。

关于古生菌转录终止信号了解甚少，但是在一些基因中，似乎反向重复序列及随后的富含 AT 序列参与此过程，这些序列很像许多细菌中的转录终止子。然而这样的序列没有在其他古生菌中发现。

所推测的另外一种类型转录终止子缺少反向重复序列，但是含有重复的一串 T。在某些情况下，它给古生菌终止作用机制传递信号使其终止转录过程。在古生菌中，没有发现类似 ρ 的蛋白质。

概念检查

RNA 聚合酶在一个特殊的位置终止转录，称为转录终止子。虽然由 DNA 编码，这些信号在 RNA 的水平上发挥功能。一些内在终止子除 RNA 聚合酶外，不需要附加蛋白质。在细菌中这些序列通常是茎-环结构，随后是一串 U 其他的终止子需要附加蛋白，例如 ρ 因子。

◆ 什么是内在终止子?

◆ 什么是茎-环结构?

7.13 转录单位

DNA 转录成 RNA 的开始和终止的位点叫做转录单位（unit of transcription）。在染色体上形成这样的单位。我们可以假设，每一个转录单位仅包含一个基因，这种情况能够发生，但并不总是如此。有一些转录单位含有两个或更多的基因，这些基因被共转录（cotranscribed），产生单个 RNA 分子。

核糖体 RNA、转运 RNA 及 RNA 寿命

正如我们在 7.1 节中所看到的那样，大部分基因编码蛋白质，但是还有一些基因编码不翻译的 RNA，如核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）和转运 RNA（transfer RNA，tRNA）。在微生物中，有几种不同类型的核糖体 RNA（一个核糖体有一种类型的单拷贝，见 7.16 节）。

原核生物含有三种类型，分别是 16S rRNA、23S rRNA 和 5S rRNA（我们在第 2 章原核生物的进化研究中，讨论 16S rRNA 的重要性）。正如图 7.33 所示，有许多含有这些 rRNA 的每一种基因，而且这些基因以簇的方式共转录。在真核生物中，也以类似的方式转录。因此，在所有的生物中，大部分 rRNA 的转录单位比单个基因都要长。在原核生物中，tRNA 的基因常常是共转录的，甚至与 rRNA 基因一起转录（图 7.33)。然而，所有这些转录物必须被加工（切割成独立的单位），产生成熟的（有功能的）rRNA 或 tRNA（图 7.33)。

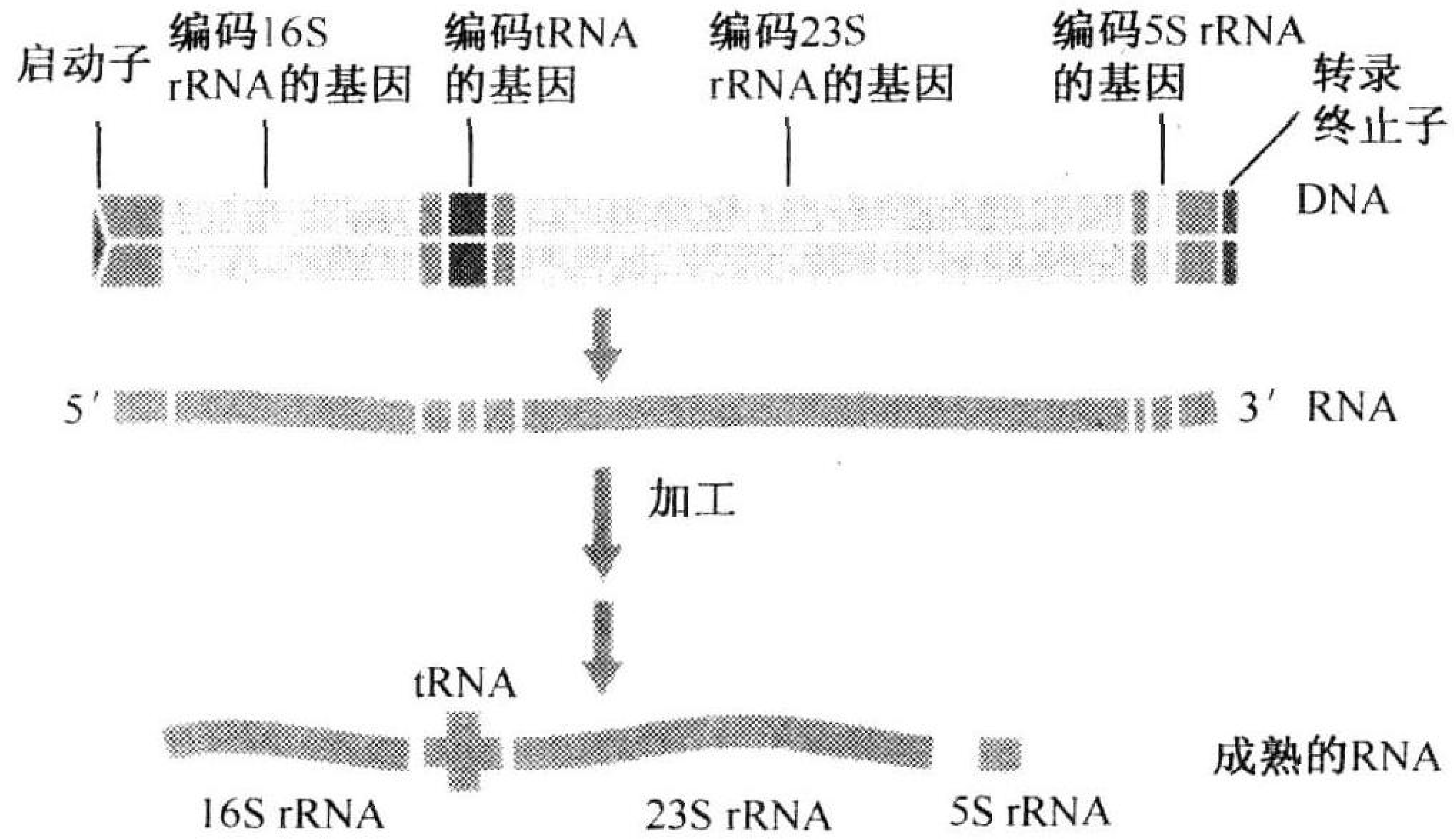


图 7.33　来自于细菌中的核糖体 rRNA 转录单位（rRNA 操纵子）及其加工。在细菌中，所有这样的操纵子含有 rRNA 的基因，依次是 16S rRNA、23S rRNA 和 5S rRNA（显示出大概比例）。在这个特别的操纵子中，16S rRNA 和 23S rRNA 之间的“间隔”含有一个 tRNA 基因。在其他的操纵子中，这个区域可能含有一个以上的 tRNA 基因，而且常常是一个或多个 tRNA 基因跟随着 5S rRNA 基因这些基因被共转录。在大肠杆菌中含有 7 个这样的操纵子。

在原核生物中，信使 RNA 有一个短的半衰期（一般保持几分钟），半衰期之后，由细胞的核糖核酸酶降解掉。相比较而言，rRNA 和 tRNA 是稳定的 RNA。这种稳定性是由于 tRNA 和 rRNA 具有高度的折叠结构，使它们能防止核糖核酸酶降解。相比较而言，正常的 mRNA 并不能形成这样的结构，易受核糖核酸酶的攻击。原核生物的 mRNA 这种迅速降解可能是一种使细胞快速适应新的环境条件的机制，并使其不再继续转录那些不再需要产物的遗传信息。

多顺反子 mRNA 和操纵子

在原核生物的遗传元件中，编码相关酶的基因常常成簇地聚在一起（图 10.42）。此时，RNA 聚合酶沿 DNA 向下游前进，并将几个基因转录成一个完整的、单个的长 mRNA 分子。能编码一组共转录基因的 mRNA 称为多顺反子 mRNA（polycistronic mRNA，见 10.13 节）。随后多顺反子 mRNA 被翻译时，由一个 mRNA 编码的几个多肽链同时合成。

我们将在第 8 章中讨论 mRNA 合成的调控，现在只介绍一下操纵子的概念。操纵子（operon）是基因表达的一个完整单位，在一个多顺反子 mRNA 中，常常包括编码几个多肽的基因（或编码 rRNA 的基因，图 7.33）。

在某些情况下，对于操纵子来说，mRNA 的转录由 DNA 的特定区域控制，这个特定区称为操纵基因（operator）。操纵基因紧邻操纵子中编码区的第一个基因。在第 8 章中我们将看到，操纵基因能够结合特异性蛋白质而发挥功能，用于调节转录过程。

多数情况下，真核生物中没有多顺反子 mRNA。因为在真核生物中，基因是断裂的（见 7.1 节，图 7.2），几乎所有 mRNA 初始转录物都需要加工。我们在第 14 章中将讨论这些问题，并对真核细胞做详尽阐述。

概念检查

转录的单位常常含有一个以上的基因，在原核生物中，可以发生由几个基因转录成

一个 mRNA 分子的情况，这样的 mRNA 可以含有一个以上多肽的信息。这样共同转录的基因连同一个启动子共同构成一个操纵子。

在所有微生物中，编码 rRNA 的基因被共转录，而后加工形成最终的各种 rRNA。

◆ 什么是信使 RNA（mRNA)?

◆ 什么是多顺反子的 mRNA?

Ⅵ 蛋白质的合成

在生物信息传递过程中，最初的两步是复制和转录，它们都涉及以核酸为模板合成核酸。最后一步是翻译，它是以核酸为模板，但最终产物是蛋白质而不是核酸。

7.14 遗传密码

在讨论翻译机制之前，首先要讨论核酸模板和多肽产物氨基酸序列之间的相应关系——遗传密码（genetic code)。正像我们在 7.1 节中提到的，3 个碱基的三联体称为密码子（codon)，它编码一种特异的氨基酸。以 mRNA 的碱基而不是以 DNA 的碱基作为遗传密码，因为参与翻译过程的是 mRNA。有 64 种可能的密码子（4 个碱基要用 3 次，4^3)。mRNA 的 64 种可能的密码子见表 7.5。注意，除专一负责各种氨基酸的密码子外，还有在翻译中起始和终止用到的特殊密码子。

表 7.5 mRNA[a]的三联体碱基序列所表达的遗传密码

密码子	氨基酸	密码子	氨基酸	密码子	氨基酸	密码子	氨基酸
UUU	苯丙氨酸	UCU	丝氨酸	UAU	酪氨酸	UGU	半胱氨酸
UUC	苯丙氨酸	UCC	丝氨酸	UAC	酪氨酸	UGC	半胱氨酸
UUA	亮氨酸	UCA	丝氨酸	UAA	终止信号	UGA	终止信号
UUG	亮氨酸	UCG	丝氨酸	UAG	终止信号	UGG	色氨酸
CUU	亮氨酸	CCU	脯氨酸	CAU	组氨酸	CGU	精氨酸
CUC	亮氨酸	CCC	脯氨酸	CAC	组氨酸	CGC	精氨酸
CUA	亮氨酸	CCA	脯氨酸	CAA	谷酰胺	CGA	精氨酸
CUG	亮氨酸	CCG	脯氨酸	CAG	谷酰胺	CGG	精氨酸
AUU	异亮氨酸	ACU	苏氨酸	AAU	天冬酰胺	AGU	丝氨酸
AUC	异亮氨酸	ACC	苏氨酸	AAC	天冬酰胺	AGC	丝氨酸
AUA	异亮氨酸	ACA	苏氨酸	AAA	赖氨酸	AGA	精氨酸
AUG[b]	甲硫氨酸	ACG	苏氨酸	AAG	赖氨酸	AGG	精氨酸
GUU	缬氨酸	GCU	丙氨酸	GAU	天冬酰胺	GGU	甘氨酸
GUC	缬氨酸	GCC	丙氨酸	GAC	天冬酰胺	GGC	甘氨酸
GUA	缬氨酸	GCA	丙氨酸	GAA	谷氨酸	GGA	甘氨酸
GUG	缬氨酸	GCG	丙氨酸	GAG	谷氨酸	GGG	甘氨酸

a. 左边的核苷酸是三联体的 5′端。要注意的是，一些终止密码子在某些生物中并不总是作为终止密码子。

b. AUG 编码 *N*-甲酰甲硫氨酸，位于细菌 mRNA 的开始位置。

遗传密码子最有意思的特点是许多氨基酸是由几个不同的而且又相关的密码子编码的。这就意味着在许多情况下，氨基酸和密码子之间不是一一对应关系。也就是在一个既定区域中知道了氨基酸并不意味着自动获得了那个区域的密码子。这种“字”和“密

码”间并不一一对应的密码子称简并密码（degenerate code）。然而，反过来的话，则是正确的。知道了 DNA 序列和正确的可读框，我们就能够确定蛋白质的氨基酸。因此可以根据 DNA 的碱基序列来测定氨基酸的序列，这也是基因组进化的中心所在（第 15 章）。

我们将看到（见 7.16 节），tRNA 上的 3 个碱基序列称为反密码子（anticodon），通过特异性碱基配对识别密码子。如果这种碱基配对总是以 A 和 U、G 与 C 这种标准配对的话，那么，对于每一个密码子，至少存在一个专一性的 tRNA。在某些情况下，确实是这样。例如，在大肠杆菌中，有 6 个携带亮氨酸的不同的 tRNA，每个对应一个不同的密码子。

通过比较，一些 tRNA 能够识别一个以上的密码子。例如，在大肠杆菌中，虽然有 2 个赖氨酸的密码子，但是只有一个赖氨酸的 tRNA，它的反密码子能够与 AAA 或者与 AAG 碱基配对（表 7.5）。这可能由于 tRNA 分子只是与密码子的前两个位点形成标准碱基配对，而第 3 个位点允许不规则的碱基配对。这种表面上的错配现象称为摆动性（wobble），图 7.34 中给出图解，在摆动性的位置允许 G 和 U 之间配对（而不是 G 与 C 配对）。

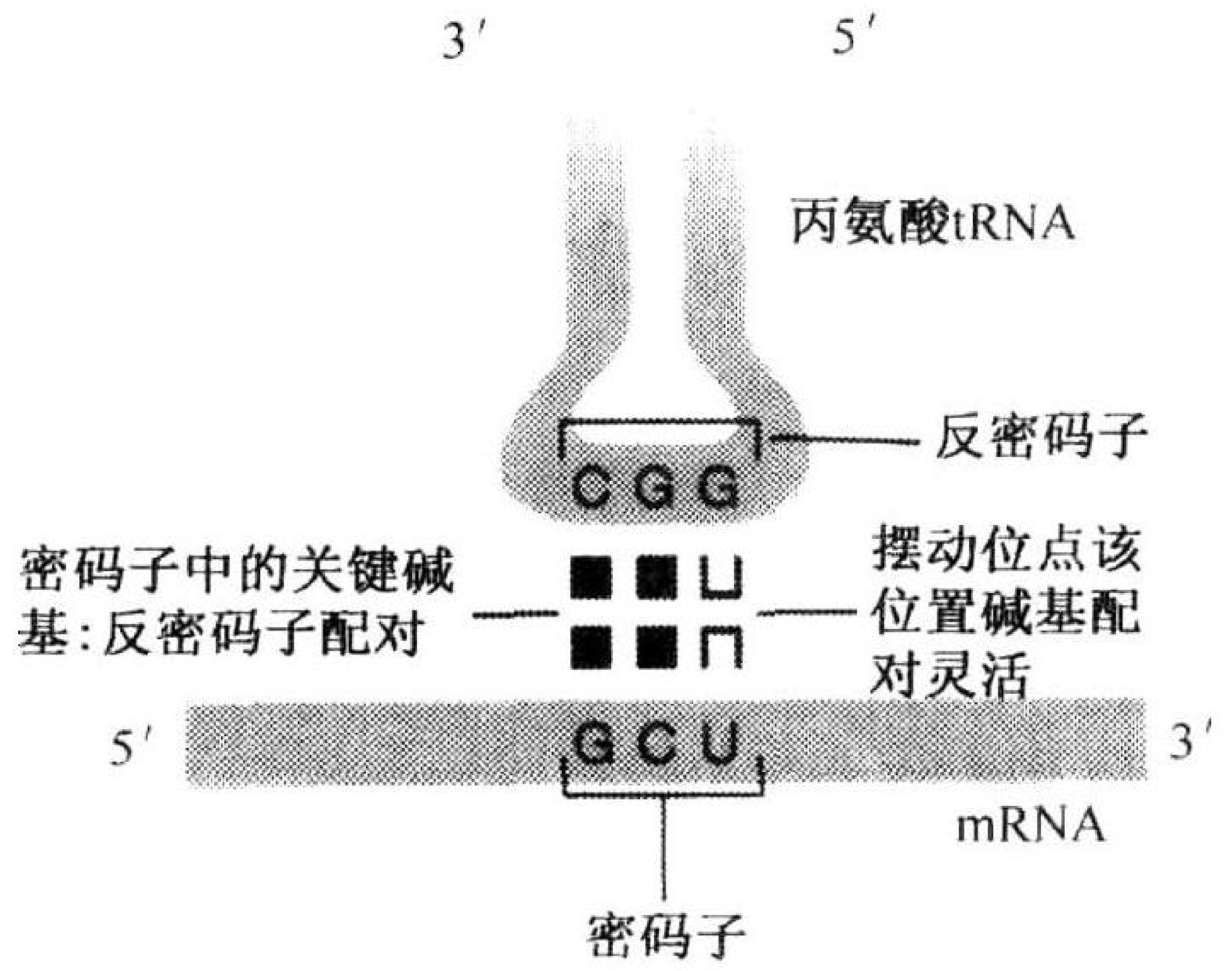


图 7.34　摆动性的概念。密码子第 3 个碱基比前两个碱基配对更加灵活。此图只给出了 tRNA 的一部分（图 7.36）。

起始和终止密码子

正如表 7.5 中看到的，有几个密码子并不编码任何氨基酸。这些三联体（UAA、UAG、UGA）是终止密码子（stop codon），它们为 mRNA 编码特定蛋白质的翻译过程提供终止信号（见 7.16 节）。终止密码子也称为无义密码子（nonsense codon），因为它们中断生长的肽链（终止翻译）。

信息通过阅读起始密码子 AUG 进行阅读，AUG 位于信息的开始，编码 *N*-甲酰甲硫氨酸（在真核生物和古生菌中是甲硫氨酸）。

如果我们考虑三联密码子在正确的区域开始翻译的话，有一个准确的起始位点是非常重要的。如果不是这样，整个可读框将移位，从而翻译出完全不同的蛋白质（假如移位在正确的可读框中引入一个终止密码，则根本没有蛋白质的形成）。

按照惯例，正确的可读框，即通过基因编码能够翻译成蛋白质的可读框，被称为“0 框”（0 frame）。如图 7.35 所示，另外的两个可读框（−1 和＋1）不编码同样的氨基酸序列。因此，核糖体找到正确的起始密码子开始翻译是非常必要的。一旦找到，它就按照一次 3 个碱基准确地沿着 mRNA 向下移动。

正如在 7.16 节中所讲到的，细菌的核糖体识别特定的 AUG 作为起始密码，需通过称为 SD 序列（Shine-Dalgarno sequence）的 mRNA 上游序列帮助来实现，在起始过程中需要这种附加的序列解释了为什么细菌中还有少数信息能够用其他密码子，如 GUG，作为起始密码子。然而这些异常的起始密码子仍然指定 *N*-甲酰甲硫氨酸作为起始氨基酸。

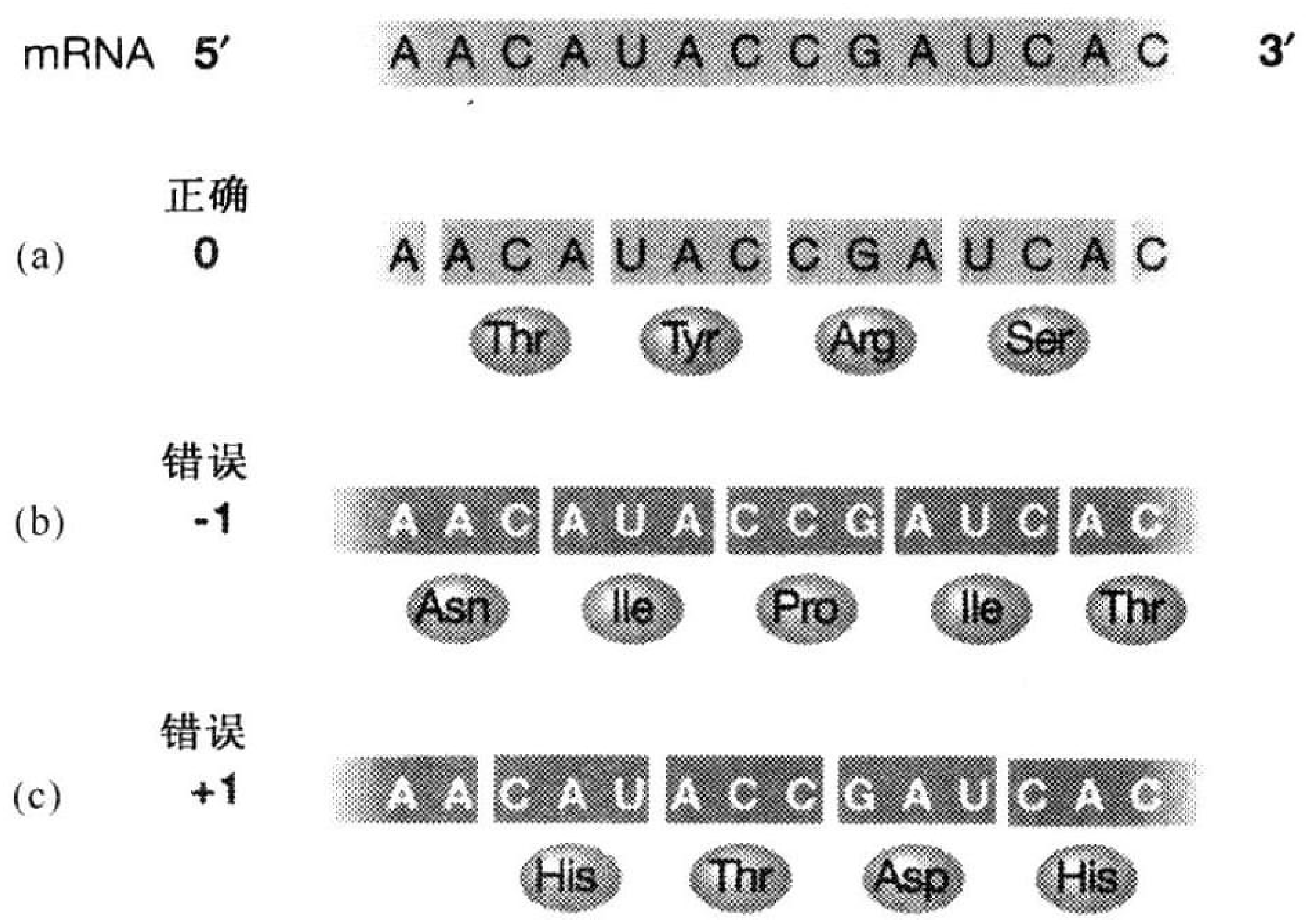


图 7.35 在 mRNA 中可能的可读框。图示 mRNA 内部序列。(a) 核糖体以正确的可读框开始翻译编码的氨基酸（称为 0 框）。(b) 核糖体以－1 可读框开始翻译时编码的氨基酸。(c) 核糖体以＋1 可读框开始翻译编码的氨基酸。

可读框

目前我们已经测序了许多微生物的基因组（第 15 章)。除非科学家能够测定出编码蛋白质的基因，否则大量的序列数据是无用的。确定编码蛋白质基因的一个常用方法是测定 DNA 每条链的可读框（open reading frame，ORF）的序列。

由 DNA 转录成 mRNA 的过程中，如果我们知道了 DNA 的序列，也就知道了由它转录成的 mRNA 的序列。如果 RNA 能够被翻译，它必须含有一个可读框：包含一个起始密码子（典型的 AUG)，然后在同一个可读框里后面跟着一些密码子及终止密码子。

能够依据计算机程序来检查 DNA 数据库中长的碱基序列，以寻找可读框。除了寻找起始和终止密码子外，还要搜索启动子和 SD 核糖体结合序列。对可读框的寻找在基因组学（第 15 章）和基因工程中是非常重要的（第 31 章)。如果完成一个未知的 DNA 片段的分离和测序，可读框的存在表示它能够编码蛋白质。

其他遗传密码

就目前所知，实际上所有的细胞都使用同样的遗传密码。因此，遗传密码几乎是通用密码（universal code)。然而，这种观点并不完全准确，因为通过在一些细胞器和几种细胞中发现所使用的遗传密码与通用密码相比有轻微变化（非常规氨基酸)。

不同的遗传密码首先在动物线粒体基因组中发现的。典型的“修改版”密码是用无义密码作为有义密码。例如，动物（不是植物）线粒体使用 UGA 作为色氨酸密码，而不是终止密码（表 7.5)。几种已知细胞也使用轻微变化的密码子。例如，在支原体属[*Mycoplasma*（细菌)] 和草履虫属 [*Paramecium*（真核生物)] 中，某些无义密码子却编码氨基酸。这些微生物具有较少的真正无义密码子，因为有 1 个或 2 个作为有义密码子使用。在很少情况下，无义密码子编码非通用氨基酸而不是普通的 20 种氨基酸之

一（见微生物边拦）。

密码子偏爱性

先前认为密码子的使用在细胞中是一个随机的过程。也就是遗传密码被破解之后和任何基因被测序之前，我们假定某个氨基酸的简并密码子以相同的频率使用。但是这种假设被证明是不正确的。基因组学表明密码子的使用具有高度偏爱性，而且这种偏爱性从一种微生物到另一种之间有变化。例如，大肠杆菌中，蛋白质的 20 个异亮氨酸残基只有一个是由 AUA 编码的，其余 19 个是由另外的异亮氨酸密码子 AUU 和 AUC 编码的。

密码子偏爱性的根源还不清楚，但是这些基因组学特性现在很容易辨认出，并用于基因序列信息的实际应用中。例如，在生物技术中，来自于一种微生物的基因，这种微生物的密码子的使用不同于另一种。那么，此基因克隆到后者时，就不能很好地转录。然而，利用基因工程手段，这个问题能够得到解决，或至少得到补偿使非常罕见的 mRNA 也能有效翻译。在第 31 章讲生物技术中，我们再讨论有关密码子偏爱性的问题。

知识窗：非常规氨基酸

遗传密码有针对 20 种氨基酸的密码子（表 7.5）。然而，许多蛋白质还含有其他的氨基酸。实际上，在不同蛋白质中发现有 100 多种不同的氨基酸。到目前为止，人们认为这些非常规的氨基酸是由一种标准氨基酸结合进蛋白质之后通过修饰而成的，虽然这种情况可以发生，但是至少两种非常规氨基酸通过翻译机制将其自身进入蛋白质中，这个例外就是硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸。

硒代半胱氨酸与半胱氨酸的结构相同，但是它用硒原子代替了硫原子（图 1）。已知在几种蛋白质（包括人的蛋白质）中含有这种非常规氨基酸。例如，大肠杆菌合成两种不同的甲酸盐脱氢酶，都含有一个硒代半胱氨酸残基。当对两种酶之一的遗传密码进行测序时，发现相应硒代半胱氨酸的密码子是 UGA。而在正常情况下大肠杆菌中 UGA 是无义密码子（表 7.5）。现在已经证明它不仅在大肠杆菌中，而且在其他的原核生物和真核生物（包括人类）的某些 mRNA 中，UGA 都能够直接翻译成硒代半胱氨酸。因此，硒代半胱氨酸是已知的由遗传密码子编码的第 21 种氨基酸。

吡咯赖氨酸是赖氨酸的类似物，它含有一个芳香环，而赖氨酸本身没有（图 1），

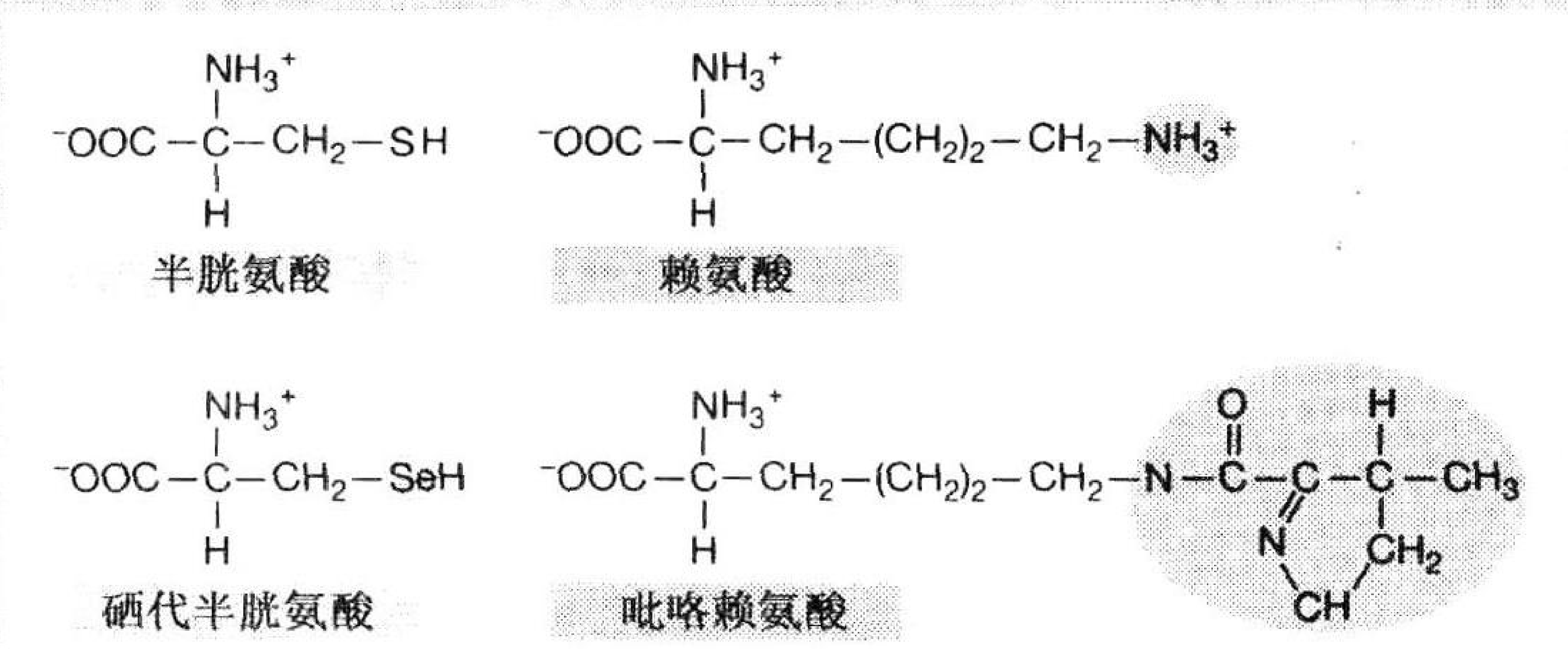


图 1　半胱氨酸/硒代半胱氨酸和赖氨酸/吡咯赖氨酸的结构比较。

这种氨基酸是在某些古生菌和细菌中发现的，但是最初发现于称为产烷微生物(methanogen)的古生菌的某些种内，这些生物的代谢活动产生天然气（甲烷，见13.4节）。在某些产甲烷微生物中，甲胺甲基转移酶含有一个吡咯赖氨酸残基。当对此酶的基因进行分析时，发现它的形成过程与硒代半胱氨相类似。无义密码UAG代替了UGA编码吡咯赖氨酸。

一个密码子为何有时是终止密码子，有时是有义密码子的呢？对硒代半胱氨酸来说，已经很清楚了，是基于密码子前后的关系，也就是说，UGA密码子周围的碱基序列。这与线粒体中"选择性密码子"不同，在线粒体中，UGA编码色氨酸而不考虑序列的前后关系。在某些序列的前后关系中，翻译机制编码UGA为硒代半胱氨酸，而在所有的其他序列的前后关系中，UGA终止翻译。

硒代半胱氨酸有它自己的tRNA（像所有的标准氨基酸一样），含有一个特殊的反密码子（UCA），并含有专一性的蛋白质因子。当翻译过程需要时，蛋白质因子会将这种tRNA带到核糖体上。

吡咯赖氨酸也含有它自己的tRNA，但与硒代半胱氨酸在关键步骤上不同。硒代半胱氨酸由丝氨酸修饰而形成，该丝氨酸是通过丝氨酸氨酰tRNA合成酶作用，使其结合到硒代半胱氨酸tRNA上。

通过比较，吡咯赖氨酸含有一个独特的氨酰tRNA合成酶，它将使吡咯赖氨酸的tRNA直接与吡咯赖氨酸相结合。

进化使遗传密码中的一些"小玩笑"成为可能，硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸就是一个很好的例子。这让我们联想到，是否还有其他不寻常的氨基酸从无义密码子或有义密码子中编码出来。

基因组时代已经简化了先前例子的查找过程，因为计算机检查核苷酸序列时，能够迅速从正常可读框中找出无义密码子。

如果重新指定有义密码子出现的话，这种检查是另外一个问题，通过计算机分析非通用氨基酸、它的同源密码子及前后序列之间的相互关系，可能会产生更有意思的惊人结果。

概念检查

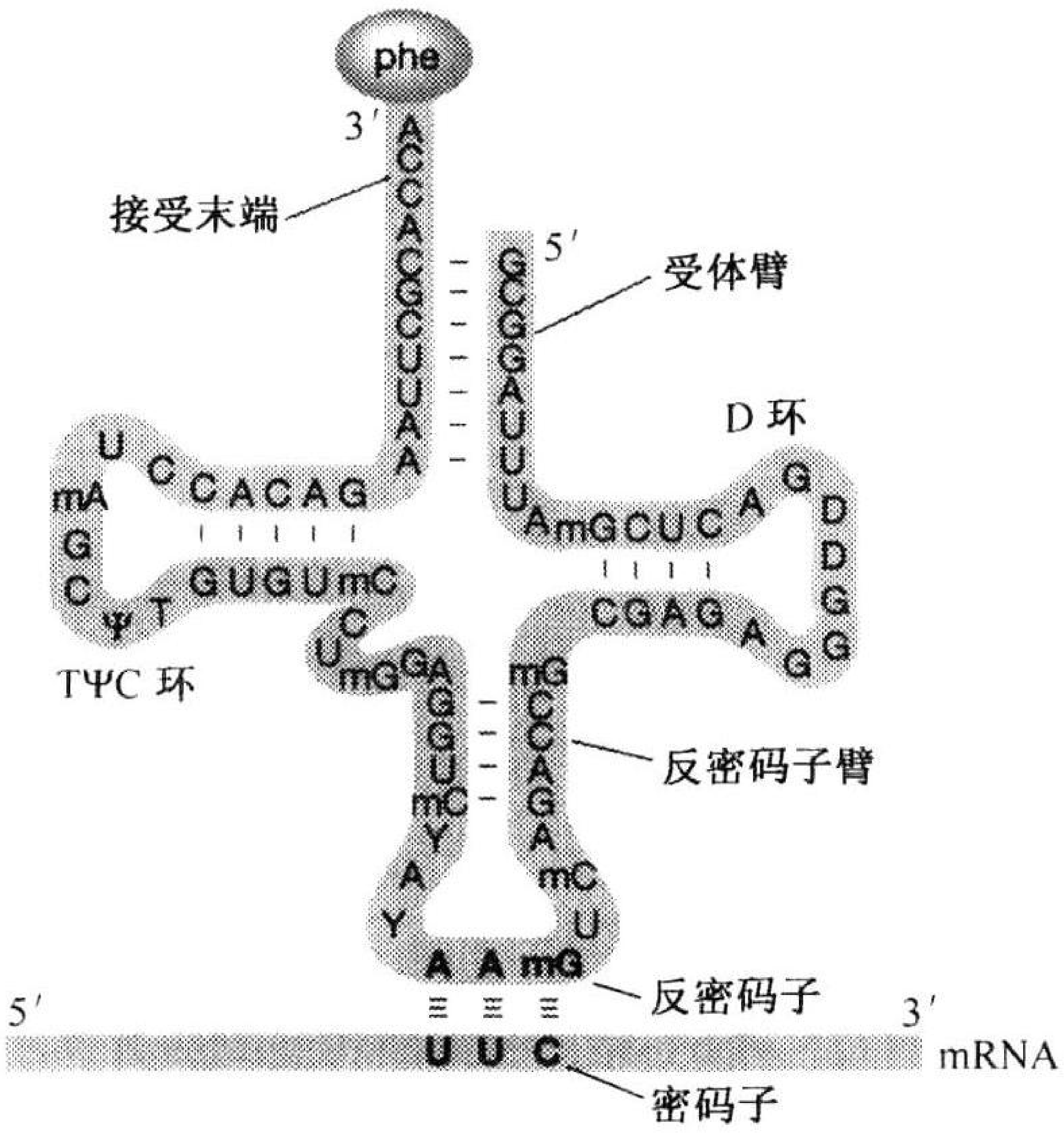
遗传密码通过RNA表达，一个氨基酸可由几个不同的但又相关的密码子编码。除了无义密码子外，还有专门的起始密码子是翻译过程开始的信号。

◆ 核糖体以适当"可读框"开始阅读为什么重要？

◆ 描述可读框。假如给出一个核苷酸序列，如何寻找可读框？

7.15 转运RNA

在7.14节中讲到，是tRNA的反密码子与密码子配对，然而tRNA不仅是一个简单的反密码子（图7.36）。它即有特异密码子又具有自身同源氨基酸。



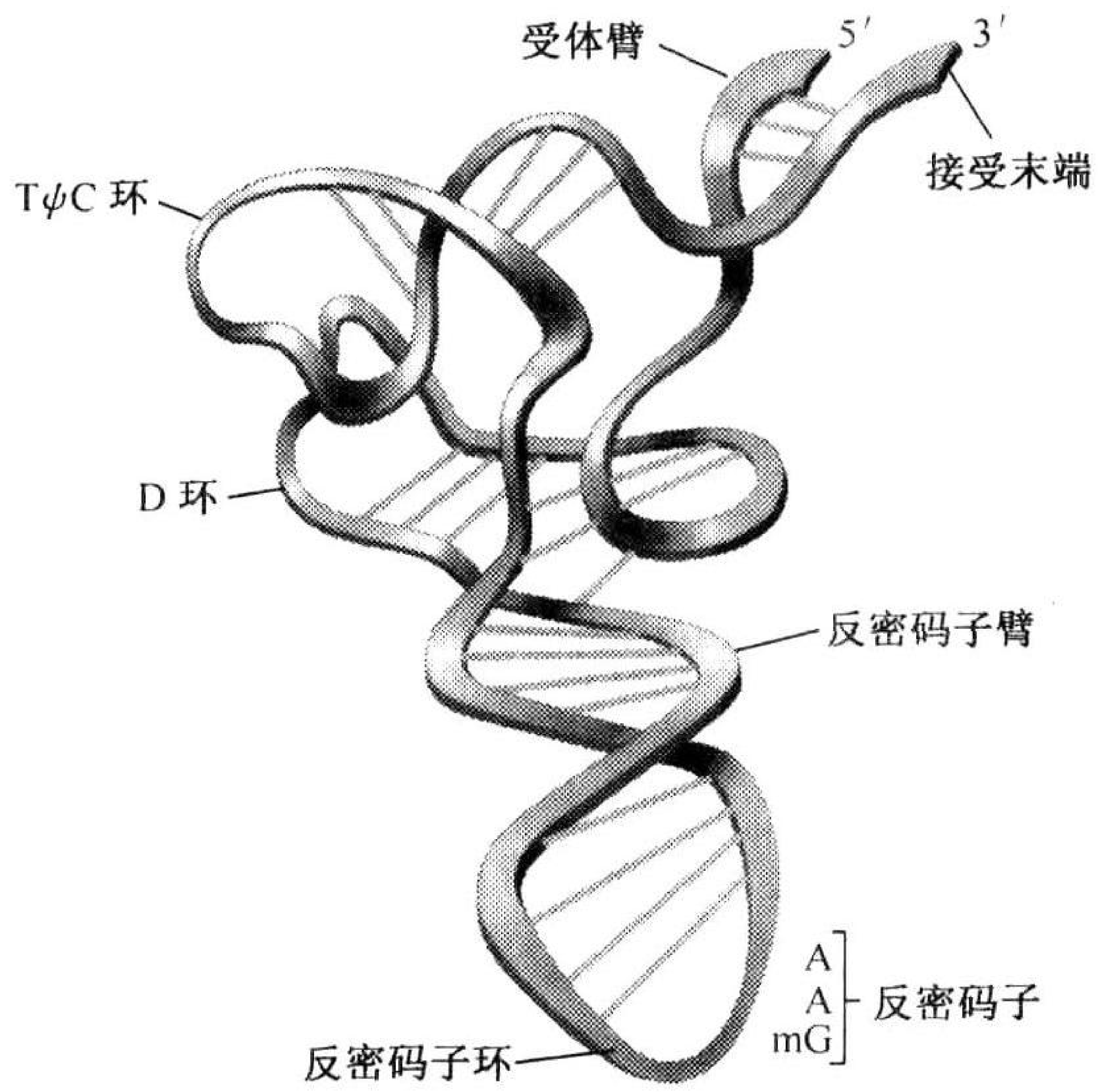


图 7.36　转运 RNA 的结构。(a) 酵母苯丙氨酸 tRNA 的标准三叶草结构。氨基酸结合在接受端的末尾 A 的核糖上。A，腺嘌呤；C，胞嘧啶；U，尿嘧啶；G，鸟嘌呤；ψ，假尿嘧啶；D，二氢尿嘧啶；m，甲基；Y，修饰的嘌呤。(b) 实际上 tRNA 分子是折叠的，所以 D 环和 TψC 环紧密结合在一起并通过疏水性相互作用联系起来。注意 tRNA 中的非常规碱基和 mRNA 中没有的胸腺嘧啶。

tRNA 与它的特异性氨基酸结合在一起，是通过专一性的酶来催化。此酶能保证特定的 tRNA 接受正确的氨基酸。这些酶被称为氨酰 tRNA 合成酶（aminoacyl-tRNA synthetase)。它们在识别同源氨基酸和结合氨基酸的特异 tRNA 方面，都有重要的功能。

tRNA 的结构

在细菌细胞中大约有 60 种不同的 tRNA，在哺乳动物细胞中有 100～110 种。转运 RNA 是一种较短，长度为 73～93 个核苷酸组成的单链分子，并含有大量的二级结构。通过比较发现所有 tRNA 中的某些碱基和二级结构是不变的，其他部分是可变的。tRNA含有的某些嘌呤和嘧啶碱基与 RNA 中普通碱基有微小区别，在 tRNA 中这些碱基被化学修饰。这些修饰发生在转录后的碱基上，这些稀有碱基包括假尿嘧啶核苷、次黄嘌呤核苷、二氢尿嘧啶核苷、胸腺嘧啶核糖核苷、甲基鸟嘌呤核苷、二甲基鸟嘌呤核苷、甲基次黄嘌呤核苷。最终的成熟 tRNA 不仅含有特殊碱基，还含有因自身折叠使链内碱基配对而形成的很多双链区域。(图 7.36)。

tRNA 的结构一般被描绘成三叶草的形式，如图 7.36a。二级结构的某些区域或者以该区域最常出现的碱基命名（TψC 环和 D 环）或者以具有的特殊功能命名（反密码子臂和受体臂）。tRNA 的三维结构在图 7.36b 中更清楚地表示出。值得注意的是，在三叶草模型中分开很远的碱基在三维构象中相距很近。这就意味着在“环”中的一些碱基实际上也是配对的。

tRNA 分子中重要的可变部分之一是含有反密码子的位置，此位点识别 mRNA 上

的密码子。反密码子存在于反密码子臂中（图 7.36）。在反密码子臂上恰好有 3 个核苷酸，它们特异性地参与识别过程，与密码子碱基配对（见 7.14 节，图 7.34）。tRNA 的其他部分与核糖体（包括 rRNA 和蛋白质组分）、非核糖翻译蛋白和活性合成酶互相作用。在所有 tRNA 链的 3′端（接受末端）是 3 个未配对的核苷酸。这 3 个核苷酸的序列经常是胞嘧啶-胞嘧啶-腺嘌呤核苷（CCA），氨基酸通过酯键共价结合到末端 A 的核糖上。通过 tRNA 的这个位置，氨基酸掺入到核糖体中生长的多肽链上，在下面的章节中将讲解这种机制。

识别、活化和 tRNA 的装载

氨酰 tRNA 合成酶对正确的 tRNA 识别涉及氨基酸自身特异的合成酶（图 7.37）与核酸的关键区域之间的特异作用。在此区域的独特序列中，tRNA 的反密码子对合成酶的识别是很重要的。但是，tRNA 和合成酶之间其他的联系位点也是重要的。在 tRNA与氨酰 tRNA 合成酶结合的研究中发现，通过突变改变 tRNA 中的特定碱基时，除反密码区外仅有少量 tRNA 的关键核苷酸参与了识别过程。关键区域的核苷酸常常是 tRNA 的受体臂或 D 环（图 7.36）。需要强调的是这种识别过程的保真度是重要的。如果错误的氨基酸结合到 tRNA 上，就可能插入到多肽链中，导致错误的蛋白质合成。

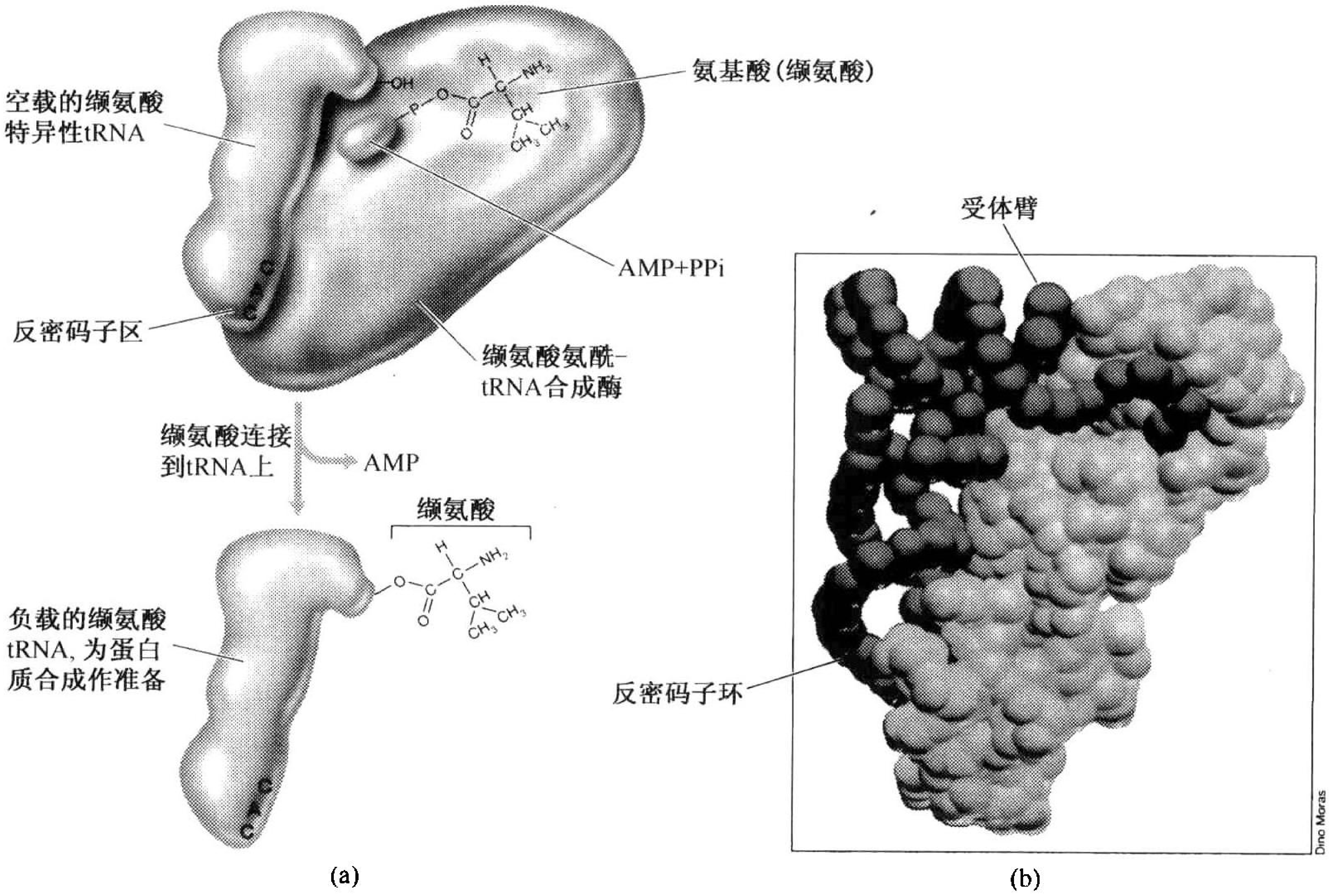


图 7.37 氨酰 tRNA 合成酶。（a）氨酰 tRNA 合成酶的作用。特定的合成酶识别正确的 tRNA 涉及 tRNA 的 D 环中特定核酸序列和受体臂及合成酶上特异氨基酸之间的作用。在这个图解中，缬氨酰 tRNA 合成酶催化最后一步反应，就是将缬氨酸-AMP 中的缬氨酸转移到 tRNA 上。（b）计算机模型表示的谷氨酰胺-tRNA（蓝色）合成酶与它的 tRNA（红色）相互作用。经允许从 *Science* 252：1682～1689（1991）© AAAS 中重印。

氨基酸和 tRNA 之间特异的化学反应是由氨酰 tRNA 合成酶催化的，首先要涉及 ATP 参加反应使氨基酸活化：

氨基酸＋ATP↔氨酰- AMP＋P-P

氨酰-AMP 是中间体，一直与酶结合着，直到碰上合适的 tRNA 分子，然后活化后的氨基酸转移到 tRNA 上形成氨酰 tRNA（图 7.37a）：

氨酰-AMP＋tRNA↔氨酰 tRNA＋AMP

在第一步反应中形成的焦磷酸 PPi 通过焦磷酸酶作用分开形成两个无机磷酸分子。由于 ATP 被利用形成 AMP，共有两个高能磷酸酯键用于氨基酸的活化和同源氨酰 tRNA 的形成。氨基酸一旦活化和形成氨酰 tRNA，就离开合成酶，并运送到正在合成多肽的核糖体上。在下一节中将讨论蛋白质合成机制。

概念检查

蛋白质中的每一种氨基酸都有一个或一个以上的转运 RNA。氨酰 tRNA 合成酶的功能是使氨基酸结合到 tRNA 上。正确的氨基酸一旦与它的 tRNA 结合，后续的特异识别就主要靠密码子-反密码子之间的相互作用完成。

◆ tRNA 反密码子的功能是什么？

◆ tRNA 受体臂的功能是什么？

7.16 翻译：蛋白质合成的过程

在第 3 章中我们讲到，决定蛋白质结构（以及最终功能）的是氨基酸序列。因此，翻译的保真度是十分重要的，也就是在多肽链的适当位置插入正确的氨基酸。这就是细胞中蛋白质合成机制的作用，包括有特殊功能的核糖体。

核糖体

核糖体（ribosome）是蛋白质合成的场所。每个细胞含有上千个核糖体，其数量与生长速率呈正相关。每个核糖体都是由 2 个亚单位组成的。在原核生物中，核糖体亚单位是 30S 和 50S，产生完整的 70S 核糖体。30S、50S 和 70S 这些数字代表韦德贝里单位（Svedberg unit），也就是核糖体亚单位（30S、50S）或 70S 的沉降系数单位，表明它们在超速离心时的离心力。

每一个亚单位是一个核糖核蛋白复合物，由特定的核糖体 RNA 和核糖体蛋白构成。30S 亚单位含有 16S rRNA 及大约 21 种蛋白质，而 50S 的亚单位含有 5S 和 23S rRNA 和大约 34 种蛋白质（表 7.6 和图 7.38a）。在大肠杆菌中，至少有 53 种不同的核糖体蛋白，大部分一个核糖体中只有一个拷贝。

因为大肠杆菌基因组已完成测序，对核糖体也进行了长时间研究，所以应当知道在每一个亚单位里面，究竟共有多少核糖体蛋白。然而，有一些蛋白质与核糖体紧密结合，有一些则不然。另外，一些核糖体蛋白只与一种亚单位结合，有一些则与两种亚单位结合。还有一些蛋白质对核糖体的功能是必需的，它们在翻译过程的不同阶段与核糖

体相互作用，但并不认为它们是“核糖体蛋白”。另外，应该记住，核糖体是一个高度动态的结构，它的各部分交替地结合与分离，并且与细胞中许多其他蛋白质相互作用。因此，即使在大肠杆菌中测定“核糖体蛋白”的总量也是不容易的。

表 7.6 核糖体结构[a]

特征	原核生物	真核生物
完整的大小	70S	80S
小亚基	30S	40S
蛋白质数量	约 21	约 30
RNA 大小(碱基数)	16S(1500)	18S(2300)
大亚基	50S	60S
蛋白质数量	约 34	约 50
RNA 大小(碱基数)	23S(2900)	28S(4200)
	5S(120)	5.8S(160)
		5S(120)

a. 真核生物的线粒体和叶绿体的核糖体类似于原核生物的核糖体(见 14.4 节)。

蛋白质合成步骤

蛋白质合成涉及一个复杂的循环过程，在此过程中，各核糖体成分都具有专门的功能。虽然蛋白质的合成是一个连续的过程，但可以分为几个独立的步骤进行：起始、延伸及终止-释放。除了 mRNA、tRNA、核糖体之外，蛋白质合成过程还需要许多蛋白质，称为起始、延伸及终止因子。高能化合物鸟苷三磷酸为合成过程提供能量，蛋白质合成的关键步骤见图 7.38。

起始

在原核生物中起始总是由自由的 30S 核糖体亚单位开始。起始复合物由 30S 亚基、mRNA、甲酰甲硫氨酰 tRNA 和几种称为 IF1、IF2、IF3 的起始因子所组成。此步骤需要鸟苷三磷酸。50S 的亚基加入到上述起始复合物中就形成了有生物学活性的 70S 核糖体。在翻译过程结束时，释放出的核糖体再次分离成 30S 和 50S 亚基。

在 mRNA 的起始密码之前是一个由 3～9 个核苷酸组成的序列，称之为 SD 序列(Shine-Dalgarno sequence)，SD 序列负责 mRNA 与核糖体的结合。mRNA 5′端的核糖体结合位点正好与核糖体 16S RNA 3′端区域互补，这 2 个分子间的碱基配对有效地保证核糖体-mRNA 复合体的形成，进而使可读框正确。

mRNA 上 SD 位点的存在和它与 16S rRNA 的专一性相互作用允许原核生物的核糖体用于多顺反子 mRNA 的翻译，因为结合于 SD 序列后核糖体能够在遗传信息中发现每一个起始位点（见 7.13 节）。

起始总是由特异的起始氨酰 tRNA 结合在起始密码子（start codon）AUG 上开始的。在细菌中，起始的氨酰 tRNA 是甲酰甲硫氨酰 tRNA。后来在多肽链的 N 端除掉甲酰基；因此完整蛋白质末端的氨基酸是甲硫氨酸。因为 SD 位点（rRNA 和 mRNA 之间相互作用）指导着核糖体结合于适当起始位点，原核中所用的起始密码子除了 AUG 之外还有其他密码子，最常见的是 GUG。然而，此时 GUG 就会募集甲酰甲硫氨

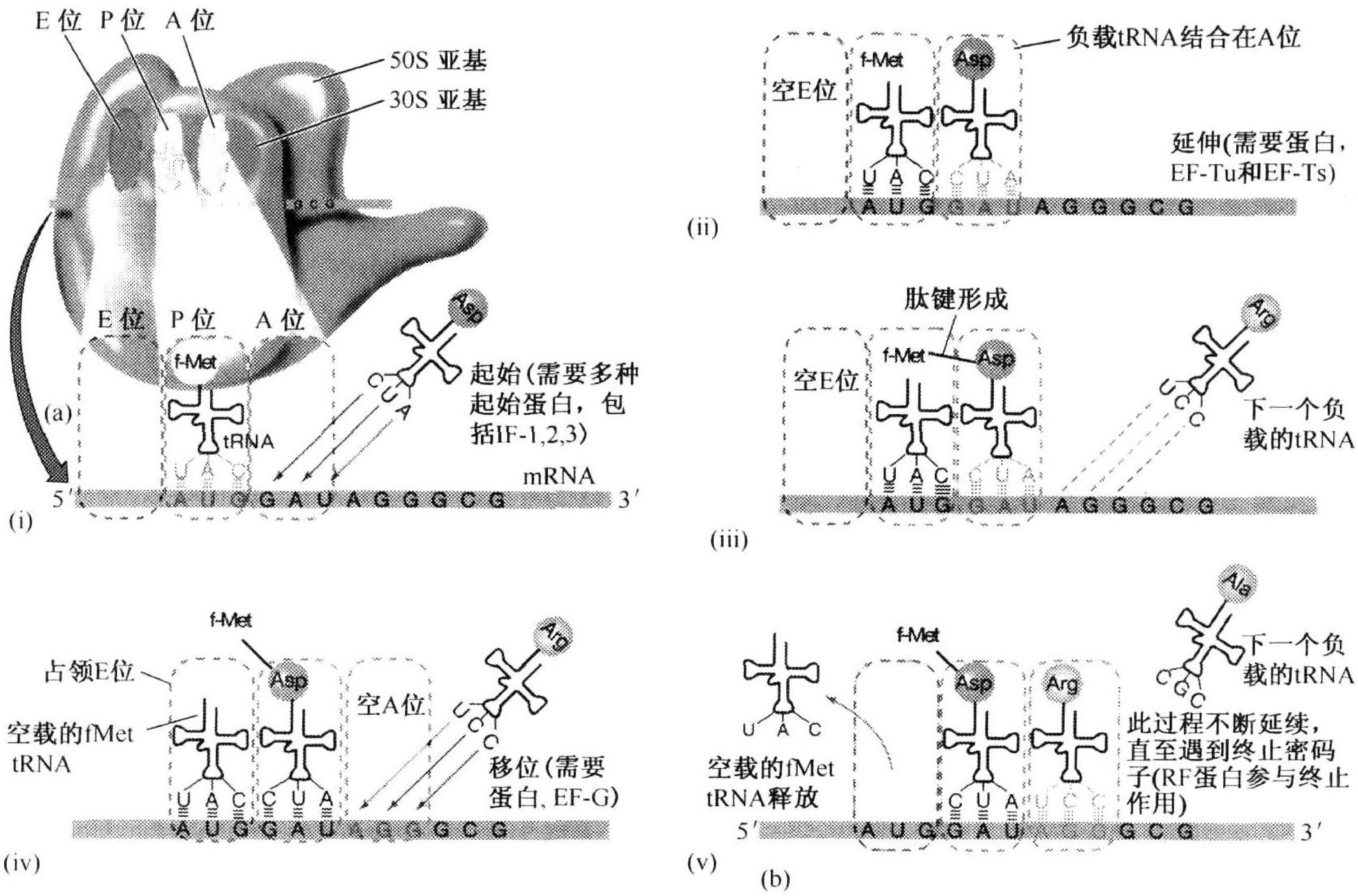


图 7.38　核糖体和蛋白质合成。(a) 核糖体结构，表示出 A 位点（接受位点），P 位点（肽位点）E 位（退出位点）。(b) 翻译起始和延伸（i、ii）通过密码子和反密码子之间的相互作用使氨酰 tRNA进入正确的位置。图示的是第一个起始 tRNA 和第二个氨酰 tRNA。(iii) 邻近 tRNA 上的氨基酸之间形成肽键，完成延伸。(iv) 核糖体从一个密码子到下一个密码子移位伴随着 tRNA 从 E 位释放。(v) 下一个氨酰 tRNA 结合到 A 位。

酸起始 tRNA（而不是缬氨酸，表 7.5）。

在真核生物和古生菌中，起始的是甲硫氨酸，而不是甲酰甲硫氨酸。在细胞中，所有蛋白质都是由甲硫氨酸或甲酰甲硫氨酸起始的。但它们并不总是所有蛋白质的第一个氨基酸。因为通过特异性蛋白酶从许多成熟蛋白质中去除了甲硫氨酸（或甲酰甲硫氨酸）。

延伸、移位和终止

mRNA 最初与 30S 亚单位结合而穿过核糖体。核糖体上还存在着与 tRNA 相互作用的其他位点。有两个位点主要位于 50S 亚单位上，称为 P 位点和 A 位点（图 7.38b）。A 位点是接受位点，新的氨酰 tRNA 首先结合到 A 位点，即通过一系列称为 EF-Ta 的延伸因子（EF）蛋白的帮助，使得 tRNA 与 A 位点结合。

P 位点是肽位点，在肽位点上由 tRNA 控制肽链生长。在肽键形成的过程中，随着新肽键的形成肽链移动到 A 位点的 tRNA 上。对于延伸过程，还需要几种非核糖体蛋白参与，尤其是 EF 家族蛋白（如 EF-Tu 和 EF-Ts），此外，还要有 GTP 参加（图 7.38b 中，省略了延伸因子，只给出了核糖体蛋白）。随着延伸进行，携带着肽的tRNA 必须从 A 位点向 P 位点移动，从而为下一个氨酰 tRNA 加入空出 A 位点（图 7.38b）。

每次移位都需要一个称为 EF-G 的专一性 EF 蛋白和 1 个 GTP 分子。在每一个移位步骤中，核糖体向前移动 3 个核苷酸，在核糖体的 A 位点上露出 1 个新的密码子。移位过程使空载 tRNA 移动到第 3 个位点，称 E 位点。实际上 tRNA 是由这个退出位点（exit site）从核糖体上释放出去的（图 7.38b）。移位步骤的准确度是蛋白质合成精确度的关键。核糖体必须在每一步移位时准确移动 1 个密码子。在此过程中，看上去好像是 mRNA 通过核糖体复合物在移动，实际上是核糖体在沿着 mRNA 移动。因此，图 7.38 中所标识出的核糖体的 3 个位点，并不是静止的，而是复杂的生物分子机器的动态组成部分。

当几个核糖体同时翻译一个 mRNA 时，形成称为多聚核糖体（polysome）的复合体（图 7.39）。多聚核糖体提高了 mRNA 的翻译速度和效率。因为每个核糖体行使功能都不依赖于周围的核糖体，所以每一个核糖体在多聚核糖体中都能够合成一个完整的多肽链。注意在图 7.39 中离 mRNA 5′端的核糖体上结合的肽链比较短，这是因为核糖体只读了少量密码子，而靠近 mRNA 3′端的核糖体几乎完成多肽链的合成。

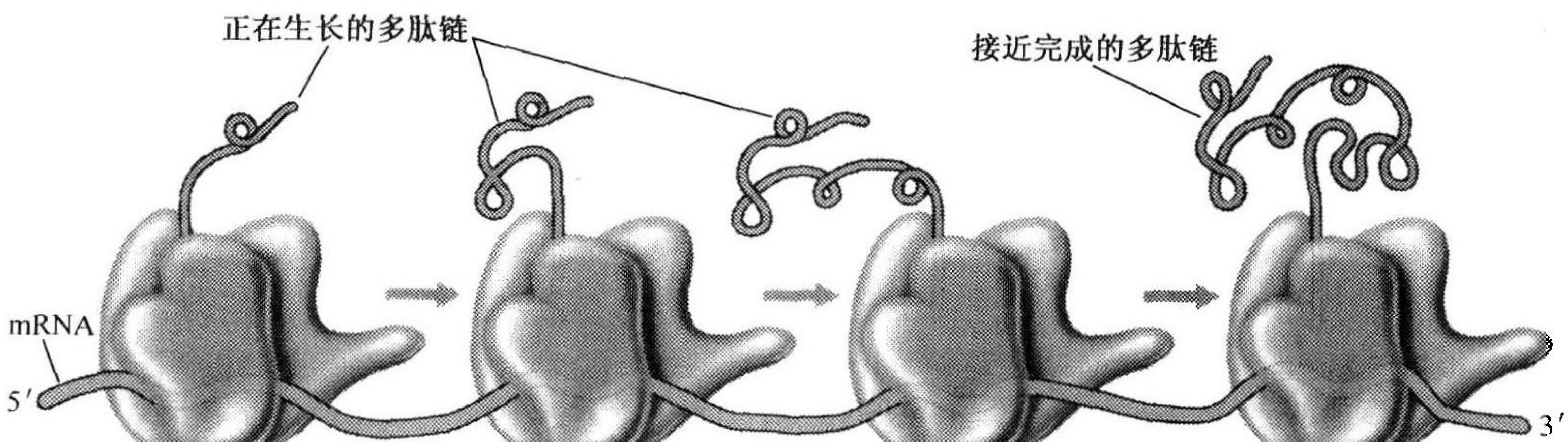


图 7.39 多聚核糖体。在一个信使 RNA 上有几个核糖体翻译形成了一个多聚核糖体。注意在翻译过程中 5′端的信息核糖体翻译最早，因此，仅有一部分多肽链被形成。

当蛋白质合成遇到无义密码子时，合成终止。没有任何 tRNA 结合在无义密码子上，取而代之的是称为释放因子（RF 因子）的蛋白质，它识别链的终止信号并从最后的 tRNA 上切下结合的肽链。随后，核糖体亚单位解体，30S/50S 亚单位又成为游离的形式，形成新的起始复合体并重复此过程。

在蛋白质合成中核糖体 RNA 的作用

核糖体 RNA 在从起始到终止的蛋白质合成所有步骤中都起着关键性的作用。核糖体中许多蛋白质的作用还不太清楚，可能是在各种核糖体 RNA 中起稳定或定位关键性功能序列的作用。

正像我们所讲的，在原核生物中，16S rRNA 涉及起始，也就是通过 mRNA 起始密码子上游的核糖体结合序列（SD 序列）和 16S rRNA 的互补序列之间碱基配对来实现起始，此外其他的 mRNA 和 rRNA 在延伸过程中发生相互作用。核糖体 RNA 在核糖体亚基的结合过程中还起着重要作用，并对 tRNA 定位于核糖体的 A 位和 P 位是重要的（图 7.38b）。

虽然负载的 tRNA 通过密码子和反密码子碱基配对识别正确的密码子而进入核糖

体，但是，它们与核糖体也有物理上的结合，是通过 tRNA 的反密码子茎环与 16S rRNA 中的专一性序列相互作用而实现的。另外，tRNA 的接受末端与 23S rRNA 的序列碱基配对。

除此之外，肽键的形成是由 rRNA 催化的。这个过程是在核糖体的 50S 亚基上进行的，称为肽基转移酶反应（peptidyl transferase reaction）。该过程并不是由任何一个核糖体或核糖体结合蛋白所催化，而是 23S rRNA 本身的活性所致。23S rRNA 在移位过程中起作用，而且 EF 蛋白与 23S rRNA 相互作用。

最后，16S rRNA 还参与了终止反应。终止作用可能是 16S rRNA 与 mRNA 相互作用或者与释放因子相互作用来实现的。因此，核糖体 RNA 除了作为核糖体的骨架结构之外，还在翻译过程中起着重要的催化作用。

在蛋白质合成中抗生素的影响

许多抗生素通过与核糖体相互作用来抑制蛋白质的合成。这些作用是相当特异的，许多已经表明涉及 rRNA。一些抗生素用于临床，一些抗生素也是有效的研究工具，因为它们对蛋白质合成的不同步骤是特异性的。例如，链霉素抑制起始，而嘌呤霉素、氯霉素、放线菌酮和四环素抑制延伸。

另外，它的临床应用是，许多抗生素仅专一性抑制系统发育领域的一种或两种生物的核糖体。所列举的抗生素中的氯霉素和链霉素，对细菌的核糖体是专一性抑制的。放线菌酮对真核生物的核糖体是专一性的。这些抗生素及其他抗生素的作用模式将在第 20 章进行讨论。

概念检查

核糖体在翻译过程中起关键性作用，它使 mRNA 和氨酰 tRNA 结合在一起。在核糖体上有 3 个位点：接受位点，氨酰 tRNA 首先接合在此位；肽位点，结合有正在生长的多肽链；退出位点。在氨基酸的每次掺入中，核糖体沿着 mRNA 向前推进 3 个核苷酸（一个密码子），tRNA 从接受位点移动到肽位点。当到达不编码任何氨基酸的终止密码子时，蛋白质合成终止。

◆ 核糖体的成分是什么？

◆ 在蛋白质合成中 rRNA 的功能是什么？

7.17 蛋白质的折叠和分泌

我们讨论了在 DNA 中以碱基序列存在的遗传信息是如何复制成同样的拷贝、如何转录成 RNA 中的碱基序列及如何翻译成蛋白质中的氨基酸序列。然而，对于蛋白质发挥功能来讲，它必须正确地折叠（见 3.6～3.8 节），而且定位于细胞的正确位置。我们将简单介绍这两个过程。

蛋白质折叠

许多多肽链合成的时候（图 7.39）自发地折叠成有活性的形式。然而，其他一些蛋白质不能够自发折叠，而需要其他蛋白质的帮助，即分子伴侣（molecular chaperone），它们帮助蛋白质适当折叠或组装成较大的复合体。分子伴侣本身并不属于组装成的蛋白质的一部分，而仅是折叠过程中的帮助者。分子伴侣的一个重要功能就是防止蛋白质的不适当聚集。

存在许多类型的分子伴侣，甚至有一些与核糖体有关。某些分子伴侣在细胞中的丰度是很高的，尤其处于蛋白质不太稳定的生长条件下（如高温）。似乎它们的分布十分广泛而且具有非常保守的序列，大肠杆菌中 4 种关键的分子伴侣是 DnaK、DnaJ、GroEL和 GroES 蛋白。DnaK 和 DnaJ 是依赖于 ATP 酶的，结合到新形成的多肽链，并阻止其过快折叠，因为这样会增加不正确折叠（图 7.40）的危险性。

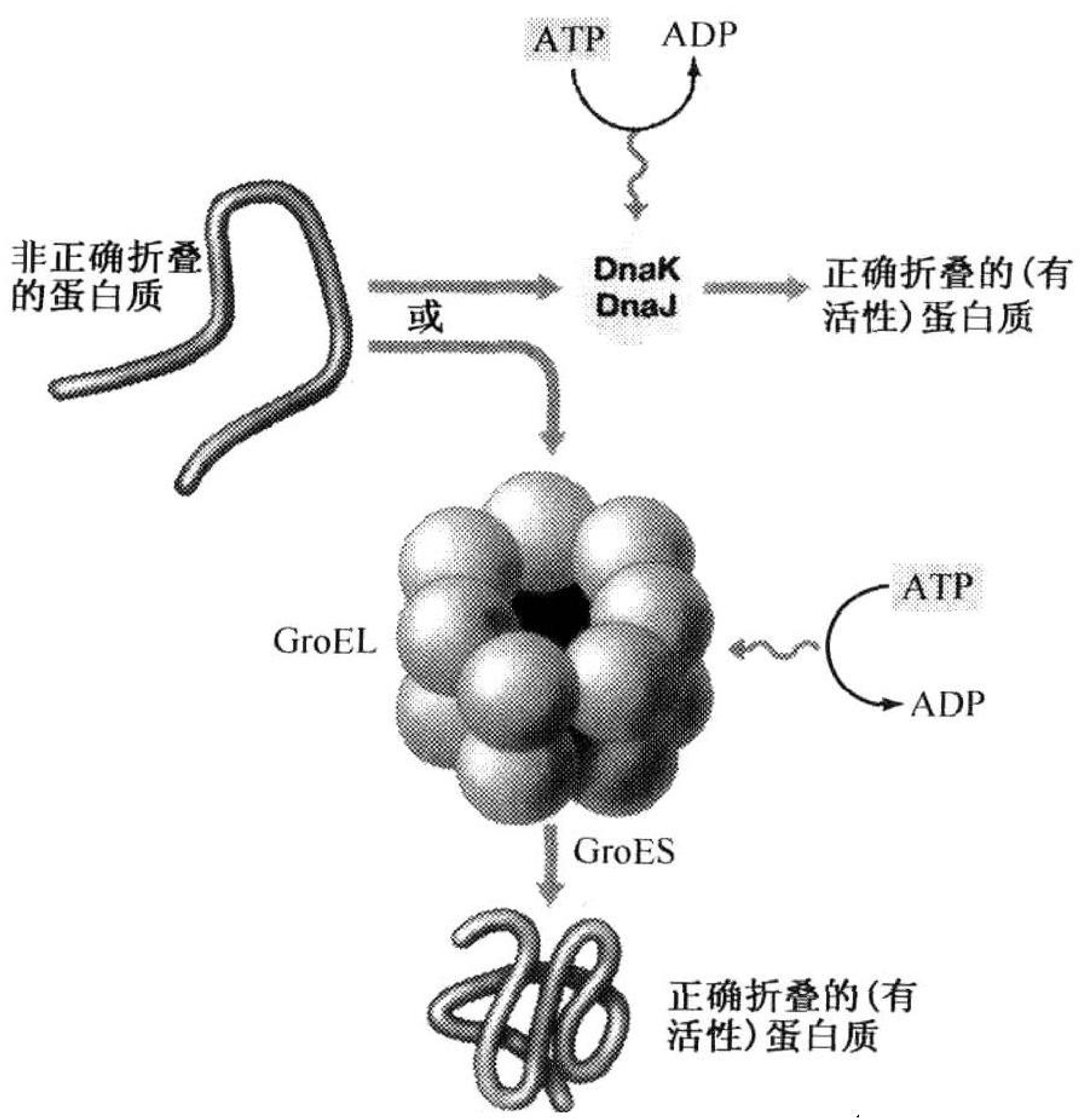


图 7.40　分子伴侣的作用。不正确折叠的蛋白质，或者通过 DnaKJ 复合体，或者通过 GroEL/ES 复合体进行再次折叠。在这两种状况下，用于重折叠的能量来自于 ATP。

因此，慢慢地折叠就提高了正确折叠的机会。假如 DnaK 和 DnaJ 复合体不能够适当地折叠蛋白质，它可以转移部分折叠的蛋白质到两个多亚基蛋白 GroEL 和 GroES 中。部分折叠的蛋白质首先进入 GroEL——一个大的桶状蛋白质中，利用水解 ATP 产生的能量，正确折叠蛋白质。GroES 在此过程中起着辅助作用（图 7.40）。

除了折叠新合成的蛋白质外，分子伴侣也能够重新折叠细胞中已经部分变性的蛋白质。之所以这种蛋白质变性能够发生，是因为微生物在其环境中短暂地经历了高温。因此，分子伴侣是一类热激蛋白（heat shock protein）。当细胞受到过热刺激时，将会极大地加速热激蛋白的合成（见 8.9 节）。热激效应是细胞的一种补偿，在蛋白酶将它们识别为非适当折叠并降解它们之前，重新折叠部分变性的蛋白质进而重新利用。重新折

叠并不是总能够成功，细胞含有多种蛋白质酶，其功能是特异地锚定并破坏那些被错误折叠的蛋白质，以便于产生氨基酸库用于制造新的蛋白质。

蛋白质分泌及信号识别颗粒

许多蛋白质在细胞质膜中发挥功能、在革兰氏阴性细胞的周质空间中发挥其功能（见 4.9 节），甚至在细胞外起作用。这些蛋白质必须从核糖体合成位点进入或穿过细胞质膜。细胞如何选择将一些蛋白质跨膜转移，而将大部分蛋白质定位于细胞质中呢？

大多数必须进入或穿过膜转移的蛋白质，在合成时具有一个外加的位于分子起始处的肽序列（15～20 个氨基酸），该序列被称为信号序列（signal sequence）。信号序列具有相当大的可变性，但在起始处典型地具有一些正电荷的氨基酸残基，中心还具有疏水的残基区，然后是极性区域。信号序列“发信号”给细胞的分泌系统，使某特别的蛋白质输出，同时防止蛋白质完全折叠，以避免这种能够干扰分泌的过程。因为信号序列是被合成蛋白质的第一部分，所以，在蛋白质被完全合成之前，输出中的前期步骤可能就开始了（图 7.41）。

信号识别颗粒（signal recognition particle，SRP）（图 7.41）在识别分泌蛋白的过程中起着关键性作用。SRP 在所有细胞中存在。在细菌中，SRP 含有一个蛋白质与一个小的 RNA 分子（称为 4.5S RNA）。这个小 RNA，既不是转运 RNA，也不是核糖体 RNA 或信使 RNA。SRP 识别含有信号序列的蛋白质，并将其传递给特异的膜蛋白复合体（如 SecYEG 复合体，见 4.7 节）。在此处，通过穿孔，分泌到周质空间或环境中（图 7.41）。在运输过程中，信号序列通过蛋白酶被除掉，此过程也是翻译后修饰（post-translation modification）的一个例子。

在古生菌中，蛋白质通过膜传送的有关知识了解不多。然而，通过基因组分析证明，古生菌也产生一种 SRP，并且与细菌在许多方面的传送过程相同。有意思的是，从系统发育相关性方面来看，古生菌的蛋白质传送过程的某些方面与真核生物也有相似之处。尤其是古生菌中 SRP 的小 RNA 的大小为 7S，与真核细胞中的相同。

折叠蛋白质的分泌：TAT 系统

在蛋白质输出的 Sec 系统中，以信号识别颗粒为媒介输出蛋白质，在到达周质空间（革兰氏阴性细胞）（图 7.41）之前，以未折叠状态或者以部分折叠状态穿过细胞质膜。然而，有许多蛋白质必须被运输到细胞之外，并含有小的辅助因子。

后者必须插入到蛋白质之中，以折叠成其最终形式。这个过程发生在细胞质中，然后，折叠的蛋白质又通过传送系统而运输。该传送系统与 Sec 系统截然不同，被称为 Tat 蛋白输出系统。

Tat 代表“twin arginine translocase”，是由 3 个英文单词字头构成的缩写词，意思是“双精氨酸移位酶”。因为运输蛋白中含有一个短的信号序列，在其中含有一对精氨酸。这种在折叠蛋白质上的信号序列，通过 TatBC 蛋白识别，并将其带到膜转运蛋白 TatA 上。

实际上，转运过程需要能量，而这种能量来自于质子动力。由 Tat 系统转运的

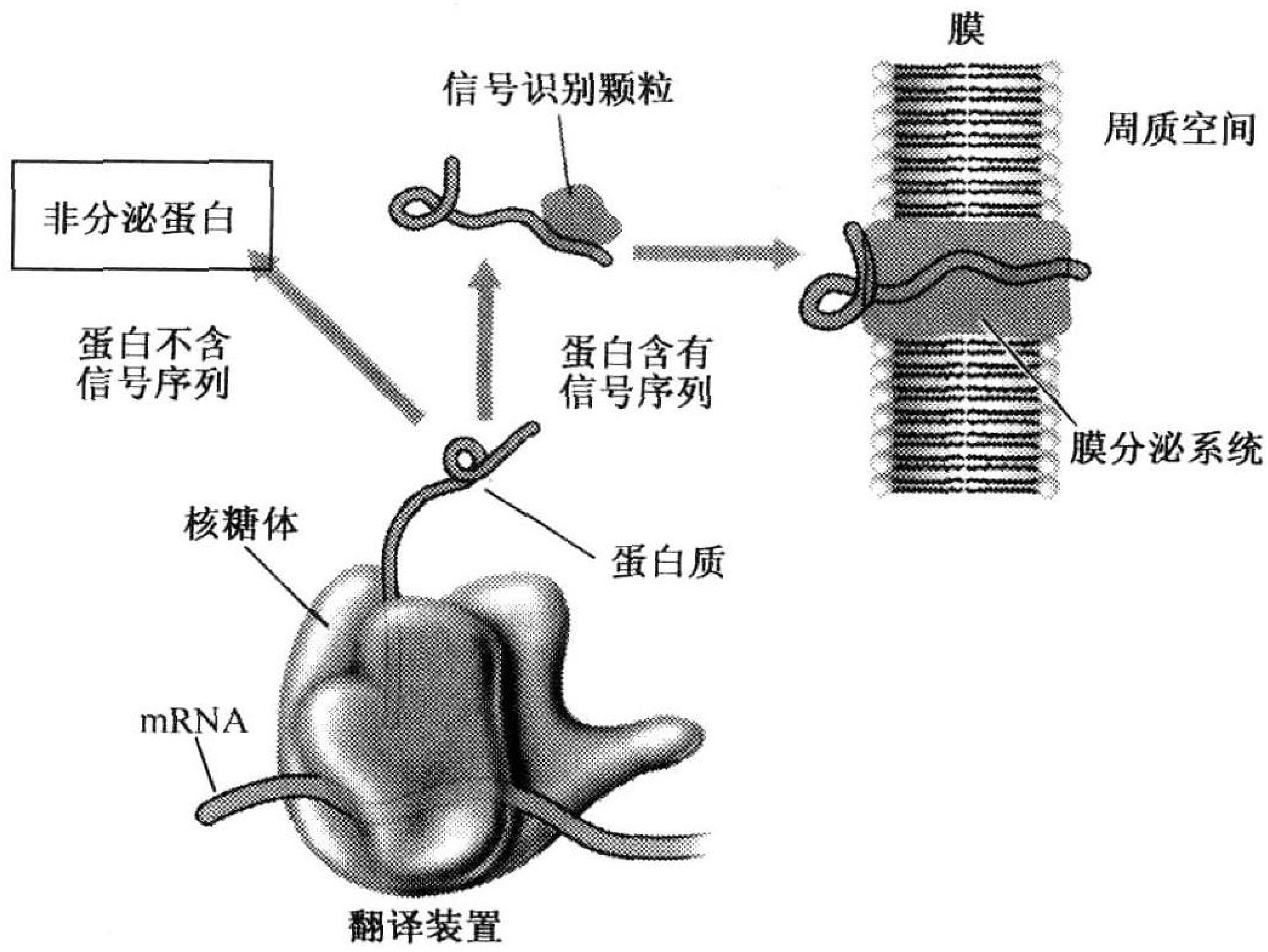


图 7.41 分泌蛋白和信号识别颗粒（SRP）。信号序列通过 SRP 识别，并且蛋白质被传送到膜分泌系统。在革兰氏阴性菌中，蛋白质分泌到周质空间（见 4.9 节）。在细菌中，SRP 的大小是 4.5S，在古生菌和真核生物中比较大，在 7S 左右。

蛋白质种类很广泛，特别是在周质空间中发挥能量代谢功能的蛋白质，包括各种硫离子蛋白和几种其他“氧化还原作用”类型的蛋白质。此外，Tat 途径转运蛋白还涉及膜外（见 4.9 节）生物合成及各种不含有辅助因子、但是在细胞质中正确折叠的蛋白质。

在本章中，我们讲述了细胞中发生的关键分子过程的要点，随后把重点转向细胞如何调节特殊基因的表达及一组基因的表达，这是一种多样而且非常精细的过程。

概念检查

蛋白质为了发挥正确功能必须适当折叠。折叠可以自发地进行，也可以由称为分子伴侣的其他蛋白参与而进行。许多蛋白质需要进入或穿越细胞膜。这样的蛋白质被合成时具有一个信号序列，该序列被细胞运输装置识别，在输出时或者输出后被切除。

◆ 什么是分子伴侣？
◆ 一些蛋白质为什么有信号序列？
◆ 什么是信号识别颗粒？

复习题

1. 描述分子生物学的中心法则。（见 7.1 节）
2. 在知道基因的化学性质之前就发现了基因，不考虑其化学性质，给基因下个定义。基因是由什么组成的？（见 7.1 节）
3. 反向重复能够引起茎-环结构。通过含有反向重复的双链 DNA 序列表示出茎-环结

构，并表明转录物如何由这个区域形成茎-环结构。(见 7.2 节)
4. 5′-GCACGGCACG-3′序列称为反向重复序列吗？解释为什么？(见 7.2 节)
5. 当温度提高时含有丰富 AT 的 DNA 分子比富含 GC 的 DNA 分子更容易分离成两条链。基于 AT 和 GC 碱基配对的性质解释这种现象。(见 7.2 节)
6. 描述比细胞长许多倍的线性 DNA 是如何包装于细胞之中的。(见 7.3 节)
7. 列出微生物中已知的主要遗传因子。(见 7.4 节)
8. 环状 DNA 在复制过程中通常见到的一种结构称为 θ 结构。绘出复制过程图解并说明 θ 结构是怎样形成的？(见 7.5 和 7.6 节)
9. 为什么 DNA 复制极少发生错误？DNA 聚合酶Ⅲ（除聚合作用外）还有什么其他的酶活性？它如何减少复制中错误的发生？(见 7.6 节)
10. 什么是限制酶？限制酶在产生它的细胞中可能的功能是什么？一个细胞内的限制酶为什么不引起自身细胞的 DNA 降解？(见 7.7 节)
11. 为什么双脱氧核糖核苷酸有作为链终止子的作用？在图 7.26b 中，为什么凝胶中不同的带都迁移到特定的位置。(见 7.8 节)
12. 描述利用聚合酶链反应（PCR）进行基因扩增的基本原理。嗜热的和超嗜热的原核生物如何使 PCR 的应用更简单？(见 7.9 节)
13. tRNA 的基因有启动子吗？它们有起始密码子吗？请解释。(见 7.10 和 7.11 节)
14. mRNA 合成的起始和终止位点（在 DNA 上）与蛋白质合成的起始和终止位点不同（在 mRNA 上），请解释。(见 7.10 和 7.13 节)
15. 什么是摆动性？在蛋白质合成中，为什么它是必要的？(见 7.14 节)
16. 什么是氨酰 tRNA 合成酶？它们催化什么类型的反应？这些酶在细胞中大约有多少不同的类型？合成酶如何识别它的正确底物？(见 7.15 节)
17. 在核糖体上形成肽键的活性作用称为肽酰转移酶，是什么催化这步反应？（见 7.16 节）
18. 有时错误的折叠蛋白质能够再次正确地折叠，有时不能甚至被降解掉。哪一种蛋白质参与了错误折叠蛋白质的再次折叠？哪一种酶参与了错误折叠蛋白质的降解？(见 7.17 节)
19. 细胞如何知道它的哪一种蛋白质能够在细胞外发挥作用行使功能？(见 7.17 节)

应用题

1. 细菌淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）的基因组由一个双链 DNA 组成，长度为 2220kb，以厘米为单位计算这个 DNA 分子的长度。假如 DNA 分子的 85%是由编码蛋白质基因的可读框组成，而且平均蛋白质的长度是 300 个氨基酸，在奈瑟氏球菌中，有多少编码蛋白质的基因？你认为在 DNA 当中其他 15%的基因是哪一种信息的基因？
2. 对照和比较 DNA 和 RNA 聚合酶的活性，每一种酶各有什么功能？每一种酶的底物是什么？PCR 需要的是哪一种酶？PCR 反应还需要其他什么？
3. 如果 RNA 聚合酶在它的正常起始位点上游一个碱基起始转录的话，结果将会怎样？

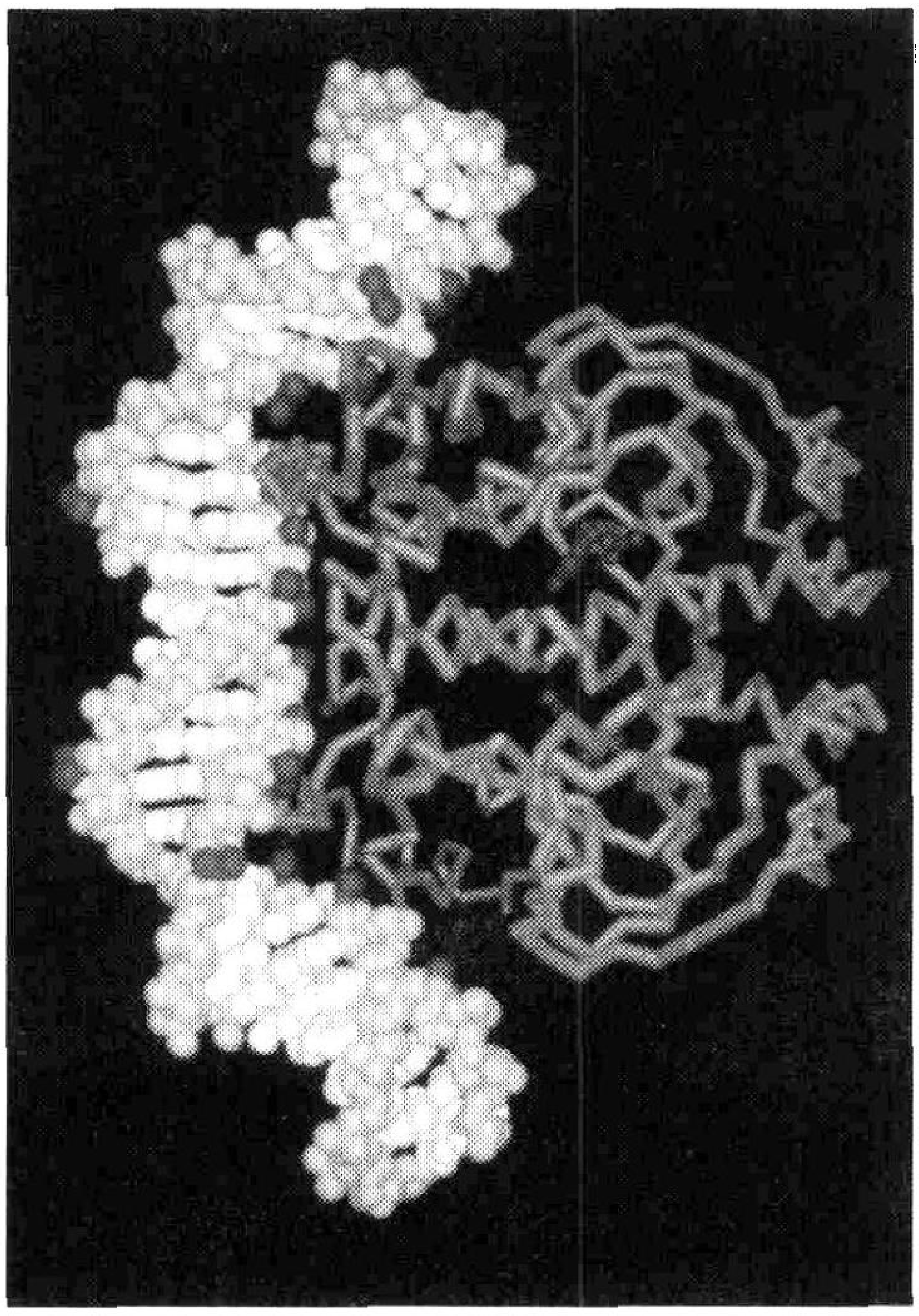
（按照蛋白质合成解释）为什么？如果翻译在它的正常起始位点下游的一个碱基开始的话，结果又将会怎样？为什么？

4. 在第 10 章中，我们将学习突变的内容，突变是基因组中核苷酸序列的可遗传变化。通过查看表 7.5，讨论遗传密码如何进化而有助于减少突变的发生。

（牛淑敏 译，乔文涛 校）

8

代 谢 调 控



细胞通过调节它们的基因表达，使得蛋白质和其他分子在细胞周期的适当时间进行适量表达。基因表达调控很大程度上受细胞所处环境的影响。

词汇表

激活蛋白（activator protein）：一种调控蛋白。在正调控中，它与DNA上专一位点结合，激活转录

别构酶（allosteric enzyme）：具有两个结合位点的酶。这两个位点分别为活性位点（底物结合位点）和别构位点（效应物结合位点）

弱化作用（attenuation）：一种控制基因表达的机制，这一典型的转录终止发生在mRNA合成起始后、终止前

反馈抑制（feedback inhibition）：代谢途径的最终产物可减弱代谢途径中第一个酶的活性

基因表达（gene expression）：基因的转录和/或翻译

热休克蛋白，热激蛋白（heat shock protein）：被突然升温或特定的其他极端因素诱导产生的一系列蛋白质，其功能是帮助部分变性的蛋白质重新折叠

诱导（induction）：仅在酶的底物存在时才合成该酶的过程

激酶（kinase）：给某一化合物添加磷酸基团的酶

负调控（negative control）：一种通过阻遏蛋白抑制基因或基因簇转录的基因表达调控机制

操纵子（operon）：在单一调控位点控制下，一个或多个基因转录成一条RNA

正调控（positive control）：一种通过激活蛋白促进基因或基因簇转录的基因表达调控机制

群体感应（quorum sensing）：生物体中的一种调控系统，只有在同种细胞密度达到一定值时调控才会发生

抑制（repression）：当某个酶催化反应的反应产物过量时，抑制此酶合成的过程

阻遏蛋白（repressor protein）：一种调控蛋白。在负控制中，它与DNA上专一位点结合，阻遏转录

应答调节蛋白（response regulator protein）：双组分调控系统中的一个成分，是一种调控蛋白，可以被感受器激酶蛋白磷酸化（见感受器激酶蛋白）

核糖开关（riboswitch）：一种信使RNA，可在其5′端附近结合特异性小分子，从而改变其二级结构，使之阻断翻译

感受器激酶蛋白（sensor kinase protein）：双组分调控系统中的一个成分，为细胞膜上的整合蛋白。外界信号使其本身磷酸化，然后这个磷酸基团被转移到应答调节蛋白上（见应答调节蛋白）

应急反应（stringent response）：氨基酸饥饿时激活的一种全局调控

双组分调控系统（two-component regulatory）：该调控系统是由感受器激酶和应答调节子两组分构成的（见感受器激酶蛋白和应答调节蛋白）

在前面的章节中，我们学习了以核苷酸序列形式储存在基因中的遗传信息是如何被转录成RNA的，以及接下来被翻译成多肽的过程。整个过程被称为基因表达（gene expression）。

大多数蛋白质是酶类（见5.5节），在细胞生长过程中催化几百种不同的酶促反应。但是，微生物要在自然界中生存，就必须对外界环境变化做出迅速应答。为了有效协调细胞中大量的化学反应，并使可利用资源发挥最大的效用，细胞需要调控它所产生的大量大分子物质。这些代谢调控是本章的重点。

Ⅰ 调控概述

一些酶在细胞生长的任何阶段都需要一定量的表达，这样的蛋白质被称为组成型蛋白。但是在大多数情况下，一些酶需要在特定的条件下表达而在其他条件下不表达。例如，分解乳糖的酶仅在环境中存在乳糖时才需要。微生物基因组编码的蛋白质远远多于细胞中某一特定时期存在的蛋白质。因此，调控是所有细胞生命代谢的主要过程，同时也是节省能源的一种机制。

8.1 主要调控模式

细胞中主要有两种水平的调控。一种是控制已有酶的活性，另一种是控制酶量（或者是酶的有无；图 8.1）。酶活性的调节可以发生在酶蛋白刚刚合成出来（称为翻译后）。而酶合成量的调节既可以发生在转录水平（改变 mRNA 的量），也可以发生在翻译水平（翻译或者不翻译 mRNA）。

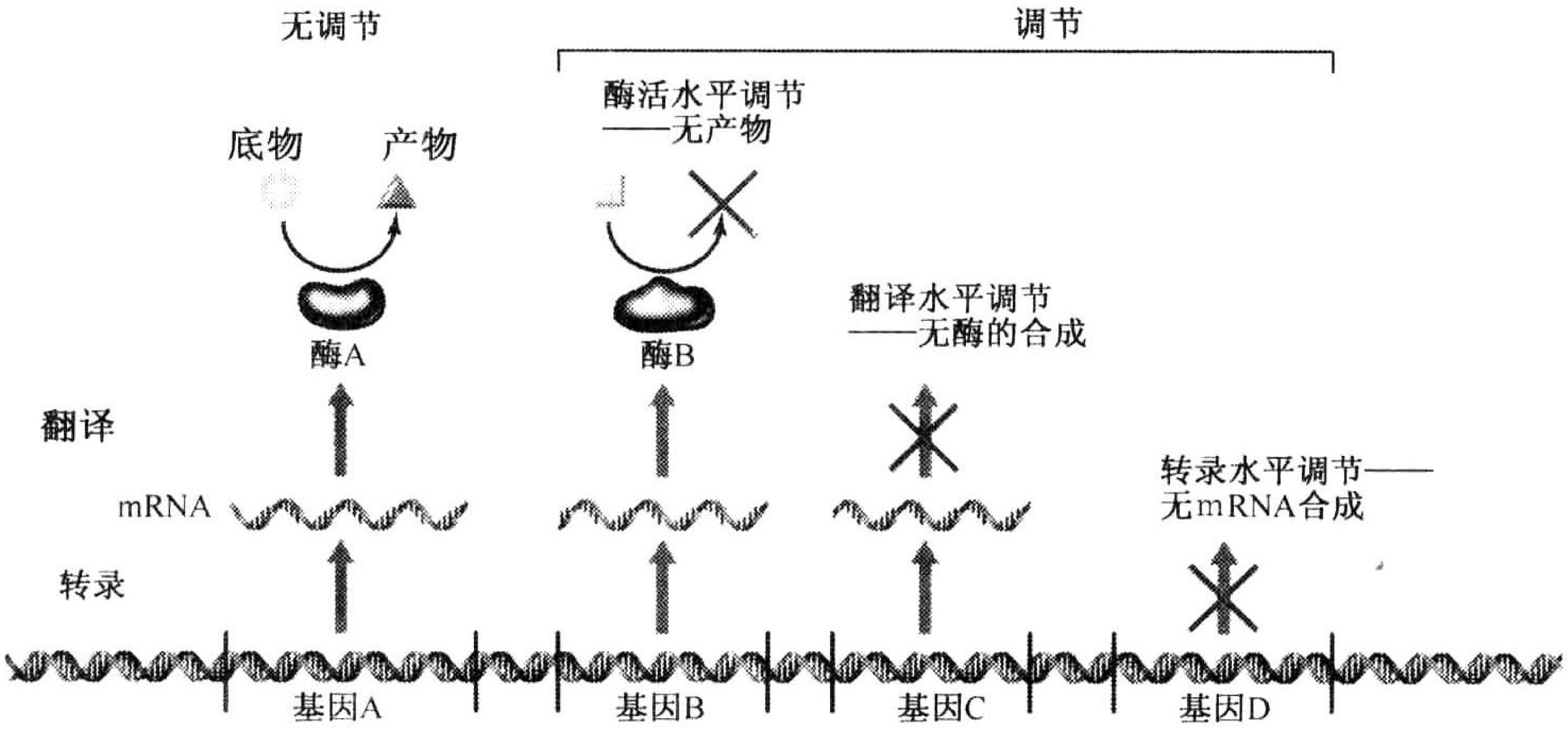


图 8.1　调控机制概述。基因 A 产物为酶 A，它们以组成型方式合成，进行反应。酶 B 也是组成型方式合成，但活性受到抑制。基因 C 产物的合成在翻译水平受到调控。基因 D 的合成在转录水平受到调控。

在原核生物中，酶活调节通常是一个迅速过程（在几秒钟或更短的时间内完成），但酶合成的调节相对是一个较慢的过程（需要几分钟）。如果需要合成一个新酶，那么它在细胞中大量存在并行使功能之前需要一定的时间。同样如果要终止一个酶的合成，也需要大量的时间。在细胞代谢中酶活性和酶有效合成的调节同时进行。

特殊基因表达水平的控制系统均有所不同，一些基因也可被多个系统所调控。在讨论酶合成的调控之前，我们先简单地讨论已有酶活性的调节过程。

概念检查

大多数基因编码的是蛋白质，大多数蛋白质又是酶。这样一个基因的表达可以在酶活性和酶合成量这两方面进行调控。

◆ 蛋白质合成的哪一步可能受到调控？

◆ 酶活调节和酶合成的调节哪个更迅速？为什么？

Ⅱ 酶活性的调节

有多种途径对已有酶活性进行调节（翻译后调控）。下面两节我们将探讨酶的可逆性调控，以及蛋白质加工时酶分子改变的调控。

8.2 非共价酶抑制作用

一些酶的活性可能会由于细胞中特定化合物的存在而被减弱甚至被抑制。这些化合物是酶行使功能时代谢途径中的特定成分。抑制作用就是酶发生了共价或非共价的改变。这一部分以非共价相互作用为例，讨论反馈抑制作用和同工酶。

反馈抑制

反馈抑制（feedback inhibition）是酶活性调控的主要机制，存在于整个生物合成途径中，如氨基酸或核苷酸的合成。这些合成途径涉及许多步酶促反应，如氨基酸或核苷酸是多步反应后的终产物，并且每一步的产物为下一步反应的底物（见 5.16 节）。在这样的途径中，终产物能反馈抑制其合成途经中第一步的酶促反应，调控自身的生物合成。

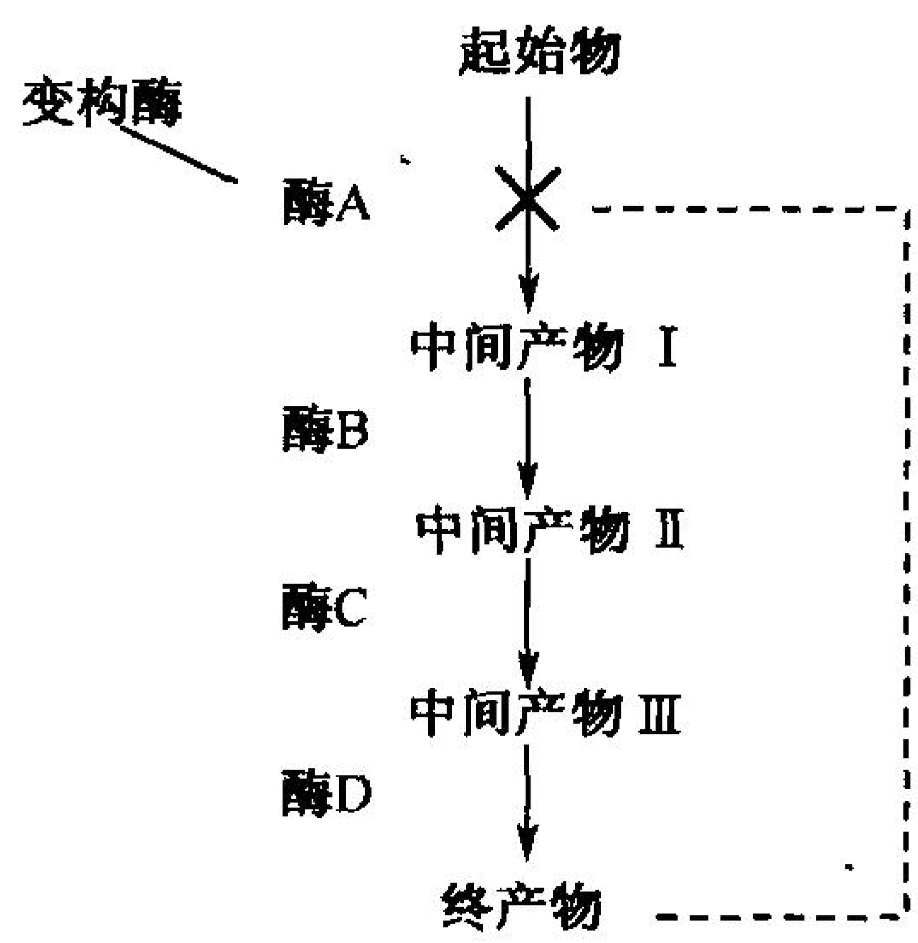


图 8.2 酶活性的反馈抑制。途径中的第一个酶的活性受终产物的抑制。因此，终产物的合成量受到了控制。

在反馈抑制中，生物合成途径中的氨基酸产物或其他终产物均能抑制该途径中的第一个酶。同时，由于在该途径中，无其他的酶作用于底物，所以无其他的中间产物产生。因此抑制合成反应第一步就可有效地抑制整个反应途径（图 8.2）。在细胞内，终产物一旦形成，它的进一步合成就会受到抑制。但是，如果终产物一旦用尽，合成又可重新恢复（图 8.2）。

由于酶作用的底物与终产物完全不同，那么终产物是怎样抑制酶活性的呢？这一现象是由它所抑制的别构酶性质决定的。别构酶（allosteric enzyme）有两个重要的结合位点：活性位点（active site）——与底物结合的位点（见 5.5 节）；别构位点——与抑制子（亦称效应子）可逆性结合的位点。一般情况下，抑制子以非共价形式

与别构位点结合，使酶分子构象发生改变，导致底物不能再有效地与活性位点结合（图8.3）。当抑制子浓度下降时，抑制子从别构位点上解离下来，酶分子活性位点又恢复到催化状态。此时的酶又具有了活性。

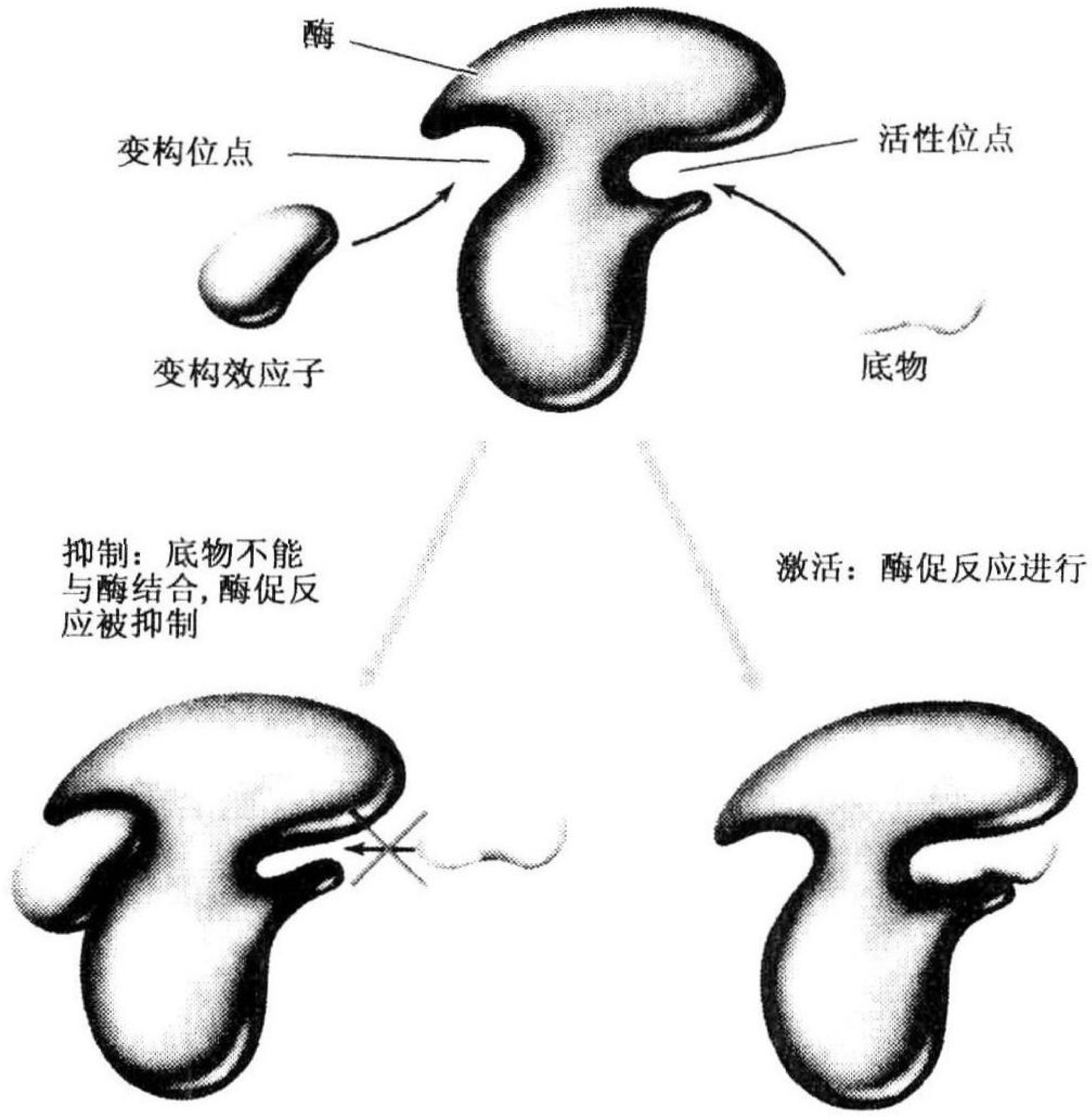


图8.3 别构效应。别构抑制子的抑制酶活性机制。当抑制子与别构位点结合时，酶构象发生改变，使底物不再能与酶结合。

在合成和分解代谢途径中，别构酶是非常普遍的。在分支途径中，别构酶尤为重要。例如，脯氨酸和精氨酸的合成均来自谷氨酸。这两种氨基酸均能控制各自合成途径中的第一个酶，该酶只是控制它们自身的合成，而不影响另一个途径，如脯氨酸的过剩并不会引起有机体精氨酸酶的缺乏（图8.4）。

人们对反馈抑制的机制研究已超出了学术范围。在第30章中，我们将会看到，通过对反馈抑制生物化学性质的认识，使工业微生物学家分离出了没有特殊氨基酸反馈抑制的突变株。利用这些突变株可过量表达某种氨基酸，从而可进行大规模商业化生产氨基酸，以用于食品添加剂（见30.7节，图30.13）。

同工酶

一些生物合成途径是由同工酶调控的。同工酶（isoenzyme）是不同的蛋白质催化相同的反应，但调控方式不同。大肠杆菌（*Escherichia coli*）中芳香族氨基酸的合成就是一例（图8.5和图5.26）。

DAHP合成酶（DAHP：7-磷酸-2-酮-3-脱氧庚糖酸）在芳香族氨基酸的生物合成中至关重要。在大肠杆菌中，三个不同的DAHP合成酶的同工酶都催化代谢途径中的第一个反应，并且这三种酶分别受各自终产物氨基酸的调节。然而与上面提到的反馈抑制例子不同的是，在这一调控中，抑制子并不能完全抑制酶的活性，而是随着终产物的

增加初始酶活的总活力逐渐减少，直至三种终产物均过量时初始酶活才能降至零。但有些生物体只用单一的酶就能完成同样的过程，这种方式称为协同反馈抑制（concerted feed back inhibition），即每一个产物都部分地抑制酶活，只有当三个产物都过量时才完全抑制该酶的活性。

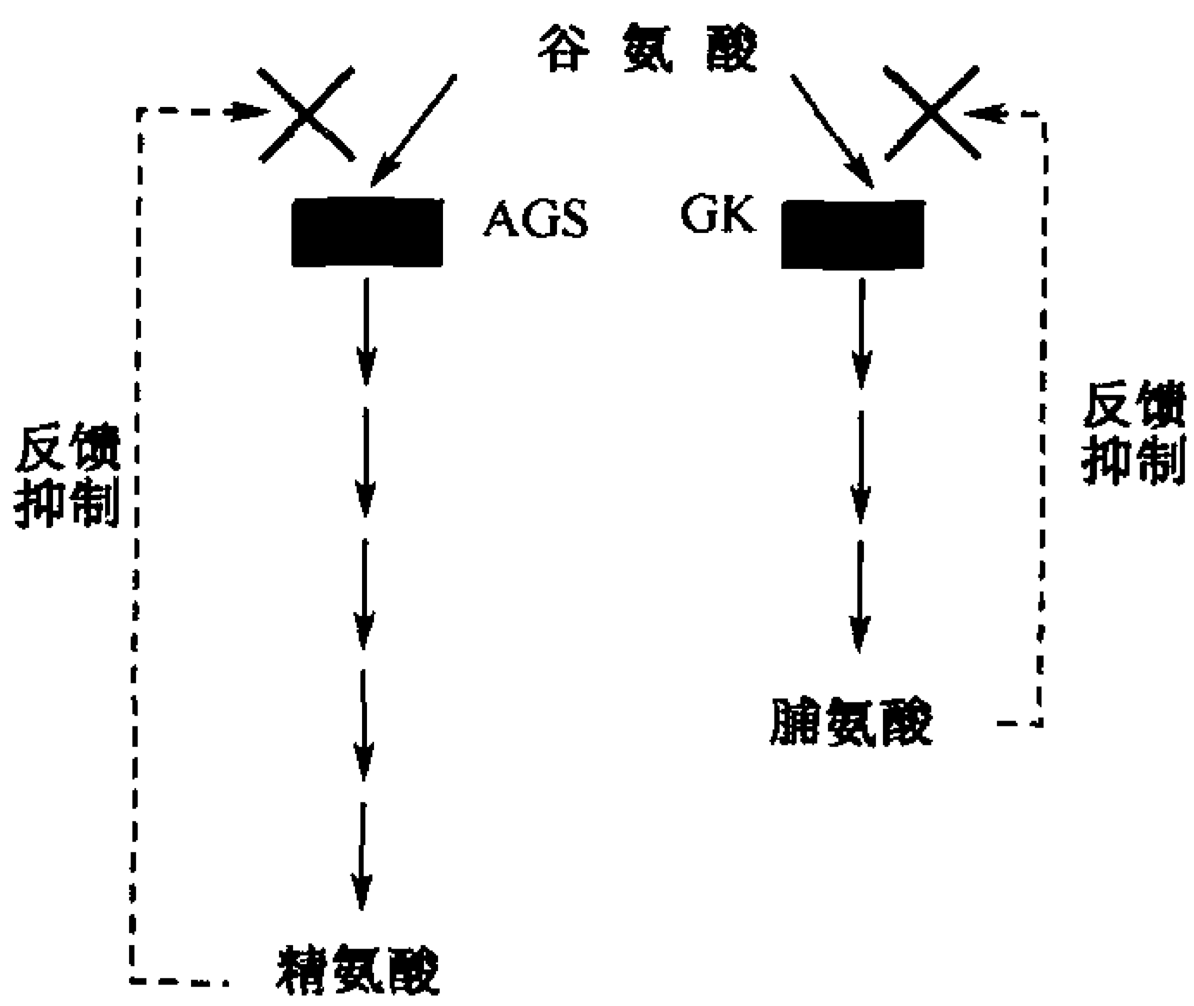


图 8.4 分支生物合成途径中的反馈抑制。每个途径的关键中间产物用粉红色表示。被抑制的酶（红色虚线箭头）是 *N*-乙酰谷氨酸合成酶（AGS）和 γ-谷氨酰激酶（GK）。

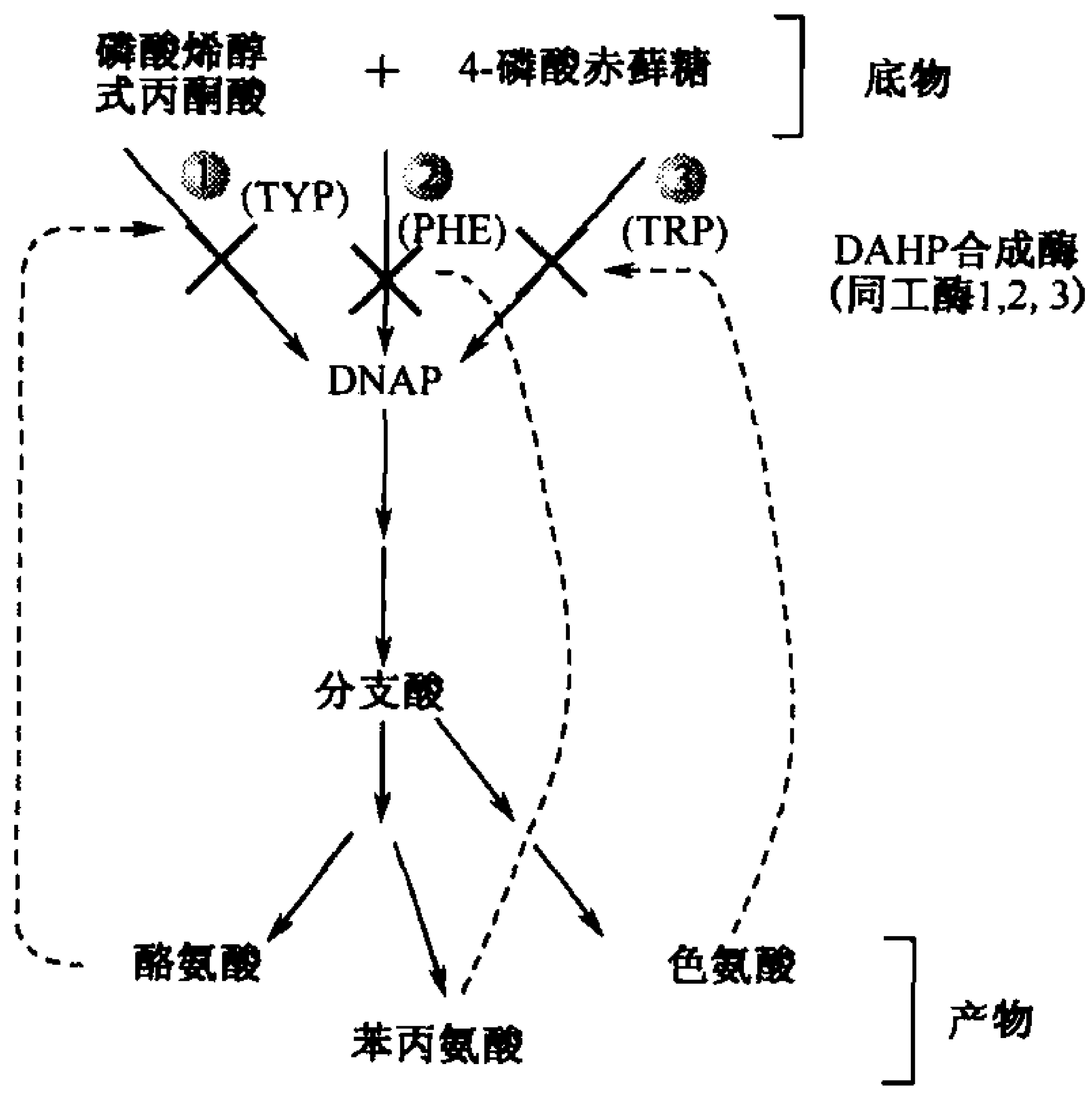


图 8.5 同工酶与反馈抑制。在合成芳香族氨基酸的途径中包括三个 DAHP 合成酶的同工酶（DAHP：7-磷酸-2-酮-3-脱氧庚糖酸）。这三个酶中的每一个都受一个芳香族氨基酸的专一性反馈抑制。三种氨基酸全部过量，DAHP 合成才能完全终止。

概念检查

控制催化酶的活性可以调控许多代谢反应。反馈抑制是酶活调节的一个重要类型，生物合成途径中的终产物专一性的抑制反应途径中第一个酶的活性。

◆ 什么是反馈抑制？

◆ 什么是同工酶？

8.3 酶的共价修饰

在细菌中有几个通过共价修饰（covalent modification）调节酶活的例子，即通常为一些小分子结合到酶蛋白上或从其上除去。就变构蛋白来说，修饰基团的共价结合改变了蛋白质的构象，从而影响酶的催化活性。修饰基团一旦除去，活性状态又可恢复。共价修饰的常见机制为酶与腺嘌呤单核苷酸（AMP）、腺嘌呤双核苷酸（ADP）、无机磷（PO_4^{2-}）、甲基化（CH_3）基团的结合。本节以研究清楚的谷氨酸合成酶为例来讲解酶的共价修饰，该酶的活性受 AMP 的调节。

谷氨酸合成酶和腺苷酰化

谷氨酸合成酶（glutamine synthetase，GS）可以结合 AMP 而被腺苷酰化（adenylylation）修饰。GS 在细胞同化氨的过程中起重要作用（见 5.16 节）。GS 的活性可以在两个水平调节。首先，GS 的活性可以被 9 个不同的化合物反馈抑制，包括几种氨基酸和核苷代谢物。每一种抑制物能部分抑制 GS 的活性，9 个抑制物同时存在时完全抑制 GS 的活性。

然而，除反馈抑制外，GS 的活性也可通过共价修饰的方式调节。这种形式的调节受谷氨酸、谷氨酸前体、α-酮戊二酸、不含氨基的柠檬酸循环中间物浓度的控制（见 5.22 节）。

每个 GS 分子包含 12 个相同的亚基，每个亚基都可以在特定位点腺苷酰化。当酶完全腺苷酰化后（也就是说酶包含 12 个 AMP 基团），就失去催化活性。当它部分腺苷酰化时，就仅具有部分活性。使 GS 加上或去掉 AMP 基团的酶称为 P_{II}，P_{II} 自身也受共价修饰调节。当细胞中谷氨酸的水平下降时，P_{II} 被共价修饰，使得 GS 去腺苷酰化，酶活性增高。当细胞中谷氨酸含量升高时，GS 就高度腺苷酰化，酶活性大幅度下降（图 8.6）。GS 的活性水平可指示细胞中氮含量的水平。当氮含量低时，GS 显示出较高的活性；氮含量升高时，GS 的活性降低。由于 GS 的催化反应消耗 ATP（图 5.27b），因此这一调节对细胞能量状态是很重要的。

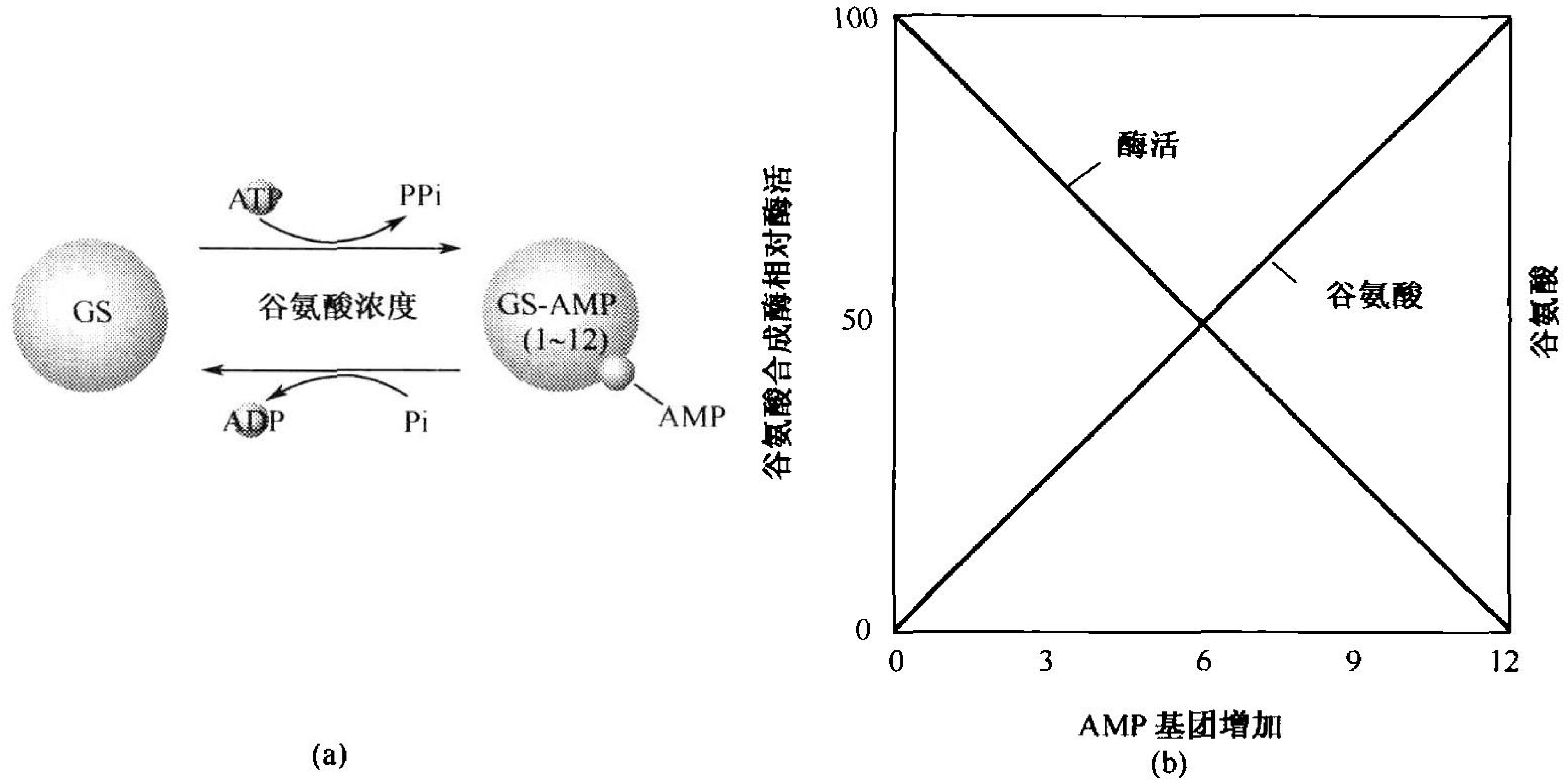


图 8.6 谷氨酸合成酶的共价修饰调节。（a）当细胞在氮源丰富的培养基中生长时，谷氨酸合成酶［GS］被腺苷酰化共价修饰，最多可以加 12 个腺苷酸（AMP）。当培养基中氮源缺乏时，修饰基团脱离变为 ADP。（b）腺苷酰化的 GS 亚基没有催化活性，所以当更多的亚基被腺苷酰化修饰时，GS 活性降低。

蛋白质加工和内含肽

通过共价修饰（如 GS 的腺苷酰化作用）调节酶活是可逆的。但不是所有蛋白质的翻译后修饰都是可逆的。某些情况下新合成的多肽需要经过加工才有活性。下面就是一些这样的例子。

如在第 7 章中介绍的，所有蛋白质的合成都是以甲硫氨酸（在细菌细胞中是以甲酰

化的甲硫氨酸）开始的。因此所有蛋白质的 N 端都应该有一个甲硫氨酸或甲酰化甲硫氨酸。然而事实却并非如此，大多数蛋白质起始位置的甲硫氨酸都会被一个特殊的酶降解（在细菌中所有蛋白质末端甲硫氨酸的甲酰化基团先被降解）。第 7 章中我们提到分泌蛋白的合成需要一个前导序列，这在蛋白质向外运输的过程中是必需的（见 7.17 节）。所有这些都是蛋白质翻译后修饰的例子。

在有些翻译后修饰的过程中，蛋白质是翻译初产物经过加工后形成的。例如，病毒中的一些基因转录并翻译成一个前体“多聚蛋白”，这是一个长多肽，然后被剪切成几个不同的活性产物。我们将在脊髓灰质炎病毒（poliovirus；见 16.8 节）和反转录病毒（retrovirus；见 9.13 节）中讨论这个例子。

另一个特殊的翻译后加工是剪切蛋白质的某些部分，然后再连接成有活性的蛋白质。我们以前提到真核基因片断中的间隔序列称为内含子（intron）。这些非编码核酸在 mRNA 剪接成最终成熟 RNA 过程中被除去（见 7.1 节和 14.8 节）。原核生物中也有一些具有内含子。但与真核生物的内含子不同，原核生物编码特殊蛋白基因中的“额外信息”是在蛋白质水平而不是在 RNA 水平被除去的。这个过程称为蛋白质剪接（protein splicing），被除去的肽称为蛋白质剪接（intein）。

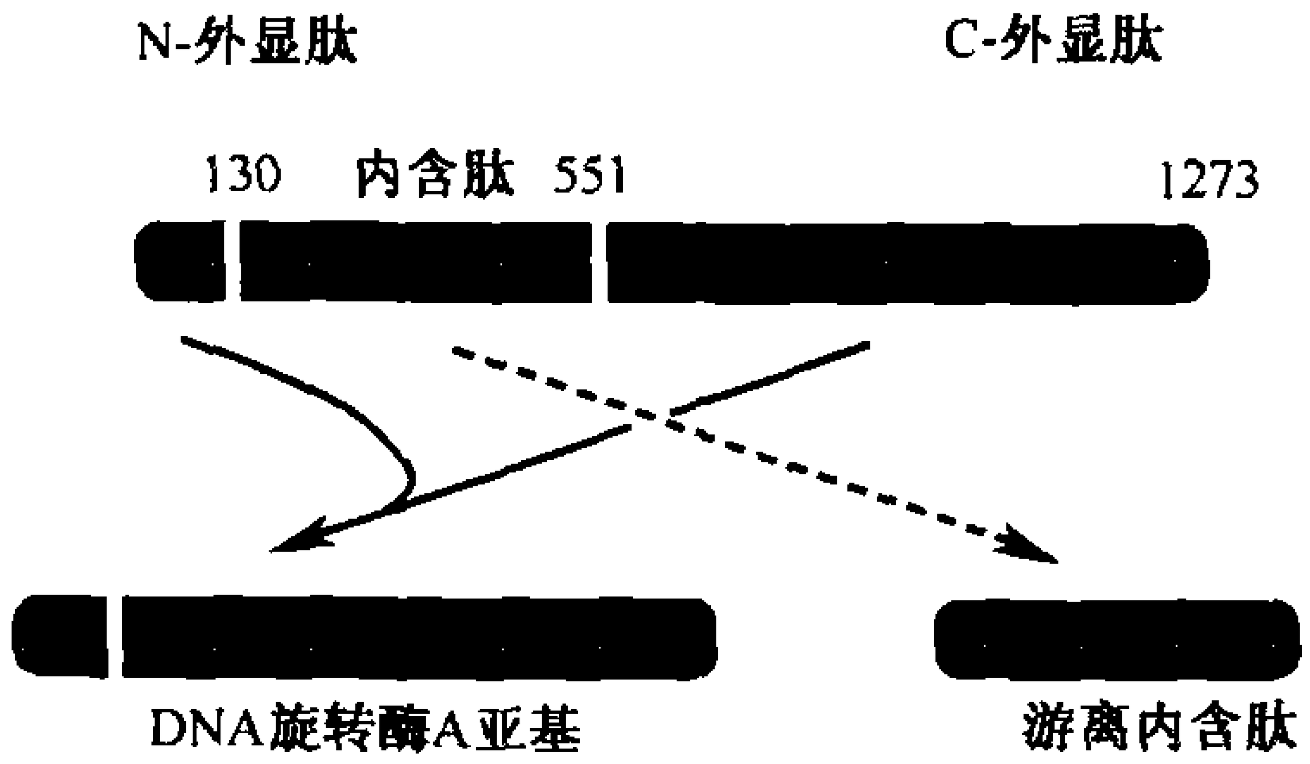


图 8.7　蛋白质剪接。从麻风杆菌（*Mycobacterium leprae*）gyrA 基因转录的 mRNA，经翻译产生的蛋白质含有 1273 个氨基酸残基。N-外显肽为氨基端外显肽，C-外显肽为羧基端外显肽。131～550 位氨基酸残基组成内含肽，通过自我剪接形成游离的内含肽和 DNA 旋转酶 A 亚基。

蛋白质剪接发生在古生菌、细菌和真核生物的多种蛋白质中。图 8.7 显示了在引起麻风病的革兰氏阳性菌麻风杆菌（*Mycobacterium leprae*）中，蛋白质剪接在 DNA 旋转酶（拓扑异构酶Ⅱ，见 7.3 节和 26.5 节）合成过程中是如何发挥作用的。编码麻风杆菌旋转酶 A 亚基的基因称为 *gyrA*；它编码 GyrA 蛋白（图 8.7）。GyrA 多肽的侧翼序列为外显肽（extein），GyrA 中的内含肽被除去后，外显肽连接在一起，形成有活性的蛋白质。由于内含肽是完全自我剪接的，因此它具有高度专一的蛋白酶活性。

为什么 GyrA 需要经过此过程才能形成有活性的蛋白质，其原因还不清楚。已有很好的证据表明（至少在真核细胞中）内含子在基因表达中起重要的调控作用。内含肽有可能在蛋白质剪接中发挥相似的调控作用。

概念检查

共价修饰是改变酶活性的一种调控机制。在此过程中酶的调控是可逆的。一种修饰是腺苷酰化（添加 AMP）。蛋白质剪接是一种翻译后修饰形式。

- ◆ 共价修饰对酶的活性有什么影响？
- ◆ 共价修饰作为一种机制如何“暂时性”的影响酶的活性？
- ◆ 内含肽与内含子的区别是什么？

Ⅲ DNA结合蛋白与转录的正负控制调控

在本章的剩余部分我们将讨论细胞控制蛋白合成量的机制，主要是真核细胞转录（transcription）水平的精确调控。

真核细胞中典型 mRNA 的半衰期最多为几分钟。这是真核细胞可以迅速对环境参数变化产生应答的重要策略。虽然重新合成 mRNA 需要消耗能量，而且翻译后只使用几次就被降解，但这个机制确实能迅速除去细胞中不必要的信息，避免了产生冗余蛋白。在细胞生长过程中，转录与 mRNA 的降解是同时存在的。

RNA 聚合酶必须识别 DNA 上特异的启动子才能进行转录。转录开启与关闭的调控都需要有特异性蛋白质结合到 DNA 上。在讨论调控机制前我们先要认识 DNA 结合蛋白。

8.4 DNA结合蛋白

小分子物质经常参与酶活调节。以图 8.4 为例，脯氨酸与精氨酸直接与酶结合抑制酶活。然而，与酶合成的调控机制是完全不同的是，虽然小分子经常参与转录调控，但很少直接作用。它们通常影响调节蛋白（regulatory protein）与 DNA 特异位点的接合，实际上是这些调节蛋白在转录中发挥调控作用。

蛋白质与核酸的相互作用

蛋白质—核酸相互作用是复制、转录、翻译过程，以及对这些过程进行调控的核心。蛋白质-核酸相互作用可以是非特异性的也可以是特异性的，这取决于蛋白质是随机结合在核酸上还是与特异序列结合。组蛋白（见 7.3 节）就是随机结合的一个例子。由于组蛋白带正电荷，因此它以非特异性的方式紧密地结合在带负电荷的 DNA 上。如果 DNA 被组蛋白覆盖，RNA 聚合酶就不能与之结合，转录便不能进行。但是，组蛋白除去后，并不能自动起始转录，只是为其他因子激活基因提供了空间。真核细胞 RNA 聚合酶与 DNA 结合并开始转录后，仍需要几种蛋白质因子协助其在转录延长过程中穿过被组蛋白包被的 DNA 模板（见 7.11 节）。组蛋白普遍存在于真核生物和一些古生菌中。

大多数 DNA 结合蛋白通过序列特异性（sequence-specific）方式与 DNA 相互作用。这些相互作用是通过蛋白质的氨基酸侧链与 DNA 的碱基和糖或磷酸骨架接合作用引起的。DNA 大沟是蛋白质结合的重要位点，这一推断在图 7.3 中显示，即大沟内含有碱基对的质子，这些质子可与蛋白质相互作用。为了获得专一性的相互作用，蛋白质必须同时与一个以上的核苷酸碱基结合，通常为多个。这就意味着特异性结合蛋白只能与含有特异性碱基序列的 DNA 结合。

在 DNA 结构中，我们已经描述过反向重复结构（inverted repeat；图 7.6）。反向重复序列，通常出现在蛋白质分子与 DNA 专一性结合的位置上（图 8.8）。如图 7.6 所示，这一相互作用与 DNA 内形成的茎环结构无关。DNA 结合蛋白通常为同源二聚体蛋白，是由两条相同的多肽链构成的。每个多肽上具有一个与大沟内的 DNA 专一性作

用的区域。当蛋白质二聚体与 DNA 反向重复序列相互作用时，二聚体蛋白中的每条多肽链分别与 DNA 的两条链结合（图 8.8）。结合蛋白并不能识别碱基序列，但是可以识别与特异碱基序列相连的特异性分子。

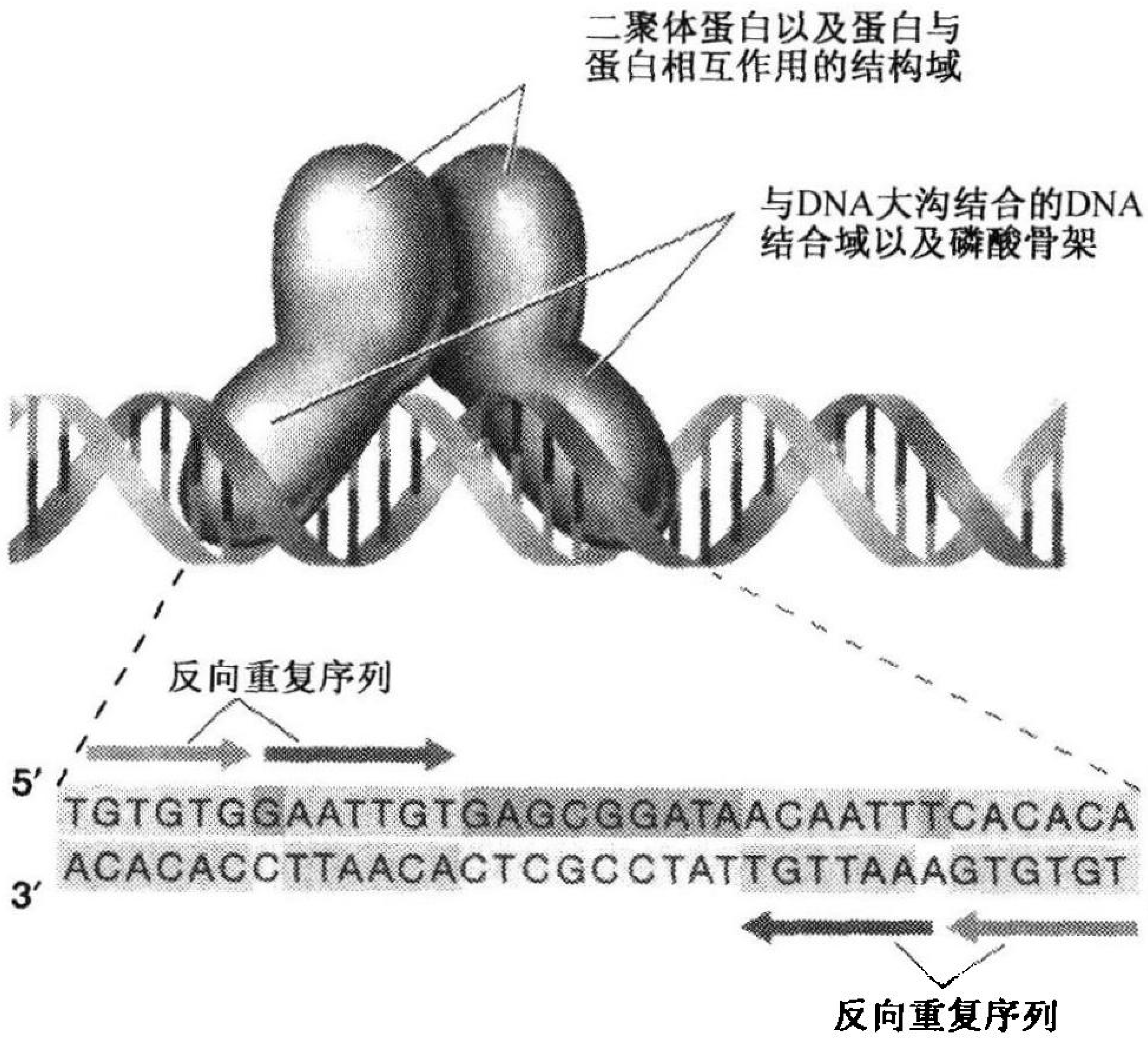


图 8.8 DNA 结合蛋白。这种蛋白质多为二聚体，特异性的与 DNA 上的两个位点结合。与蛋白质相互作用的专一性 DNA 序列是反向重复的。该图显示了乳糖操纵子中操纵子基因的核苷酸序列是反向重复的，阴影显示 *lac* 阻遏物与 DNA 结合。

DNA 结合蛋白的结构

在原核与真核生物中，通过对几种 DNA 结合蛋白结构的研究，揭示了几种重要的与 DNA 结合的结构域。其中一种为螺旋-转角-螺旋模体（helix-turn-helix motif；图 8.9）。螺旋-转角-螺旋结构是由一条含 α 螺旋二级结构的多肽链构成，这一识别螺旋可特异性地与 DNA 相互作用。识别螺旋与三个氨基酸连接——第一个氨基酸通常为甘氨酸，具有转角蛋白的功能（图 8.9a）。转角的另一端与另一个螺旋连接，这一螺旋以疏水的方式与第一个螺旋相互作用，以稳定此结构，称为稳定螺旋。蛋白质和 DNA 上特异性碱基对之间是以非共价方式相互作用，如氢键和范德华力（见 3.1 节）。

细菌中许多不同的 DNA 结合蛋白均具有螺旋-转角-螺旋结构，包括许多阻遏蛋白，如大肠杆菌的 *lac* 和 *trp* 阻遏物（见 8.5 节），以及一些噬菌体蛋白质，如 λ 噬菌体阻遏物（图 8.9b）。已知大肠杆菌中有 250 多种具有这一结构的蛋白质，可与 DNA 结合，从而调控转录。

在 DNA 结合蛋白中还存在另外两种常见的蛋白结构域。一种为锌指结构（zinc finger），通常在与 DNA 结合的真核调节蛋白中出现。“锌指”是一种连接锌离子的蛋白质（图 8.10a）。氨基酸的“指”部分形成识别 α 螺旋与大沟内的 DNA 相互作用。这种蛋白质至少有 2 个这样的指与结合有关。

另一种 DNA 结合蛋白的结构域为亮氨酸拉链结构（leucine zipper）。这一蛋白质结构是由每隔 7 个氨基酸就有 1 个亮氨酸残基的侧链构成，形似一个拉链。不像螺旋—转

角-螺旋和锌指结构那样，亮氨酸拉链本身不与DNA相互作用，而是在另外两个识别螺旋与DNA正确结合中起定向作用（图8.10b）。

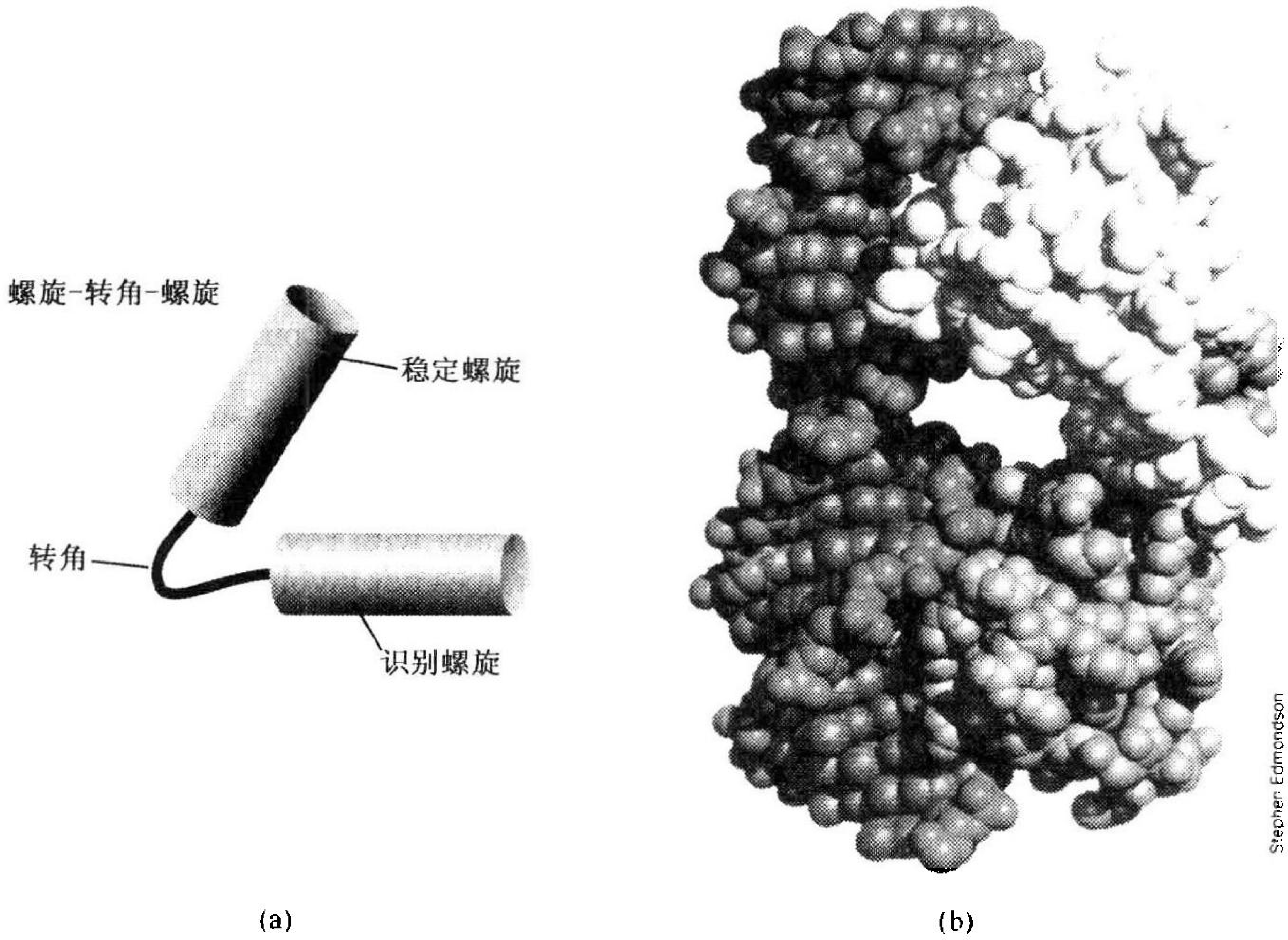


图8.9　一些DNA结合蛋白的螺旋-转角-螺旋结构。（a）螺旋-转角-螺旋成分的简单模式。（b）λ噬菌体阻遏物的计算机模拟模型，它是一个典型的螺旋-转角-螺旋蛋白，与自身的操纵基因结合。红色和蓝色部分表示DNA，棕色和黄色部分表示蛋白质。该二聚体蛋白的一个亚基用深棕色表示，另一个用深黄色表示。每个亚单位都包含一个螺旋-转角-螺旋结构。此图下载自蛋白数据库，Brookhaven NY.

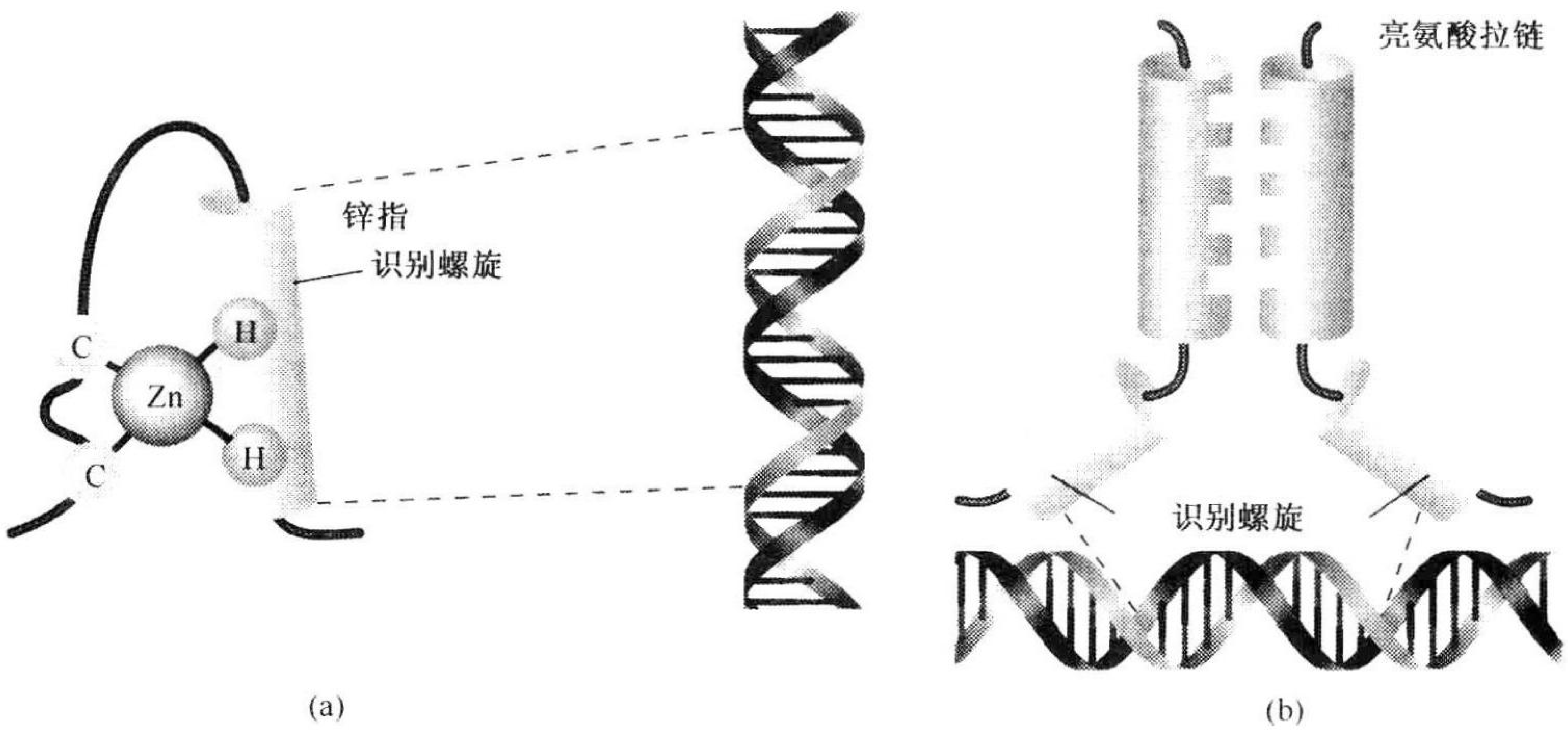


图8.10　真核DNA结合蛋白中蛋白亚结构的简单模型。α螺旋用圆筒代表，识别螺旋是参与DNA结合的区域。（a）锌指结构，具有锌离子的氨基酸总是含有至少2个半胱氨酸残基（C）与两个组氨酸残基（H）。（b）亮氨酸拉链结构，亮氨酸残基（黄色显示）总是精确间隔7个氨基酸。亮氨酸侧链的相互作用使两个螺旋靠近。

蛋白质一旦与DNA上的专一性位点结合，就会产生许多反应。在一些情况下，蛋白质是一种酶，在DNA上进行专一性反应，如RNA聚合酶催化转录的进行。但是在另一些情况下，结合蛋白或是阻遏（负控制，见8.5节）或是激活转录（正控制，见8.6节）。

概念检查

蛋白质的特殊区域可与DNA分子专一性区域相互作用使得特异蛋白与DNA结合。在大多数情况下，相互作用是序列专一性的。与核酸结合的蛋白质或是以核酸为底物的酶，或是调节蛋白影响基因表达。

◆ 什么是蛋白质的结构域？

◆ 为什么结合蛋白对DNA序列具有专一性的相互作用？

8.5 转录的负控制：阻遏和诱导

转录是生物信息传递的第一步（图8.1），因此这一步很容易影响基因表达。如果一个基因频繁转录，那么在细胞中就会存在相当丰富的该基因mRNA用于翻译，从而产生大量的蛋白质产物。细菌中已有多种控制酶合成的机制被阐明，这些调控很大程度上是受细胞生存环境的影响，特别是一些小分子物质的存在与否。这些分子指示着细胞生存环境的生理状况，并且可以与特殊的蛋白质相互作用，如前面提到的DNA结合蛋白。这样就产生了转录调控，有时甚至还会对翻译产生影响。

首先讨论阻遏和诱导，这是在转录水平上基因表达调控的最简单形式。在本节中我们只涉及转录的负控制（negative control）也就是抑制转录的调控机制（因此称为负控制）。

酶的阻遏和诱导

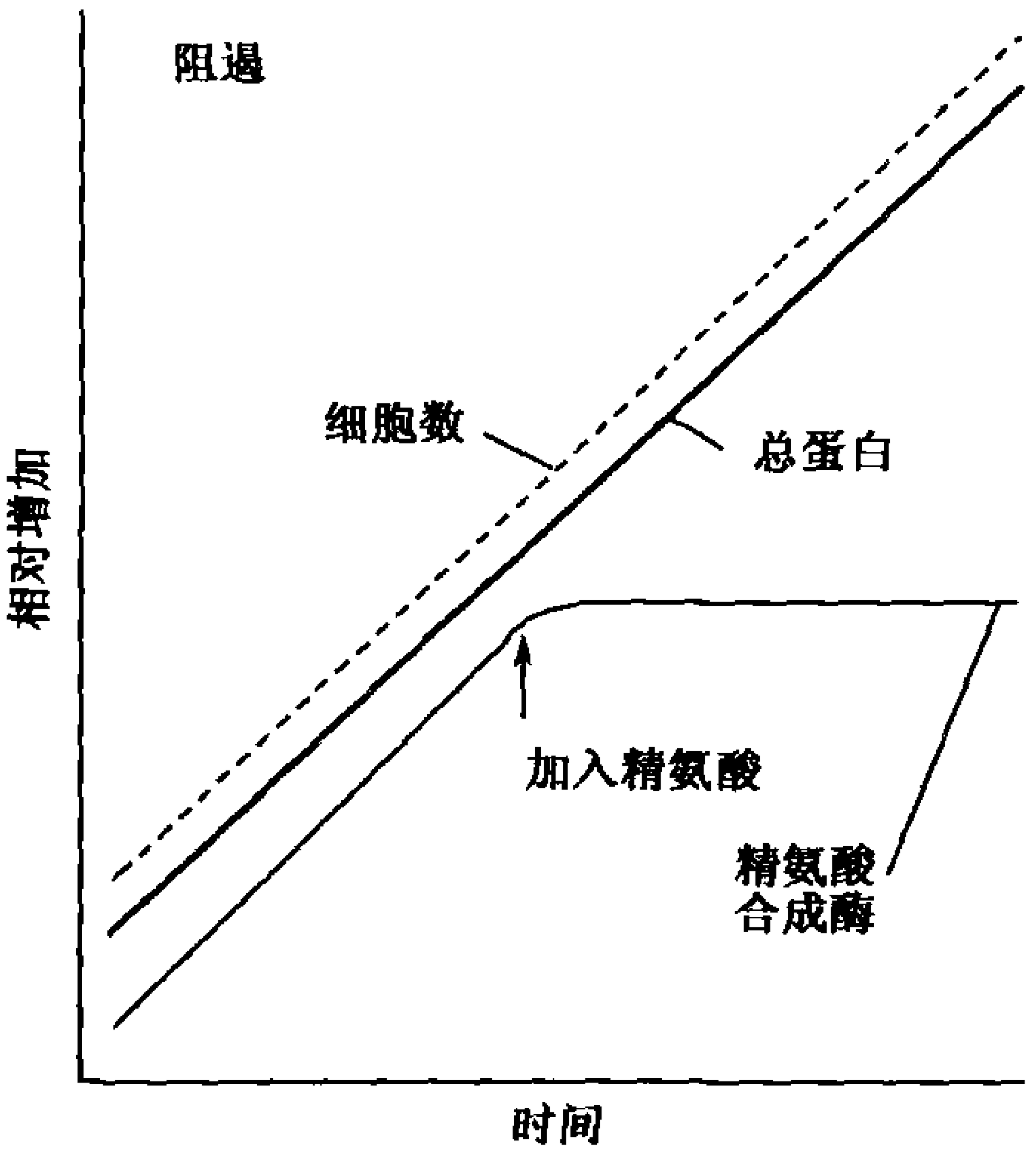


图8.11 酶阻遏。在精氨酸合成途径中，在培养基中加入精氨酸后抑制了精氨酸合成酶的合成，但总蛋白质的合成不受影响。

通常，如果在培养基中存在一定量的某种产物，催化合成该产物的酶就不会被合成。如当培养基中不存在精氨酸时，精氨酸合成所需的酶才能开始合成；当精氨酸过量时该酶的合成受到抑制，这就称为酶阻遏（enzyme repression）。

如图8.11所示，在缺乏精氨酸的培养基中，如果在对数生长期，加入精氨酸，生长仍能按原速进行，但精氨酸合成酶的合成就会终止。此外，因这一效应是专一的，所以细胞内的所有其他酶，仍按原速不断合成。这是因为被特异性抑制的酶在细胞总蛋白质中只占很小的一部分。

在细菌中，酶阻遏是相当普遍的现象——它是控制氨基酸、嘌呤和嘧啶生物合成途径中各类酶合成的途径之一。几乎在所有情况下，特殊生物合成途径的终产物均能抑制自身合成途径中的

酶。在这些情况下，阻遏是相当专一的，只影响自身途径中酶的合成，而不影响其他合成途径中的酶（图 8.11）。对有机体来说，酶阻遏的意义是很明显的，它能有效地确保有机体不再合成不需要的酶，以防止能量浪费。

酶诱导（enzyme induction）在概念上与酶阻遏相反。在酶诱导中，只有底物存在时，酶才能开始合成。典型的酶阻遏涉及生物合成（合成代谢）酶。与此相反，酶诱导通常涉及分解酶。

以乳糖作碳源和能源的大肠杆菌为例，图 8.12 显示β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）的诱导过程，该酶可以将乳糖切割成为葡萄糖和半乳糖。这个酶是当大肠杆菌培养在有乳糖的环境中才需要的。如果培养基中无乳糖，该酶就不会合成，一旦加入乳糖，该酶合成就会立刻开始。这一调控机制的意义就在于当有机体需要某种酶时才开始合成。

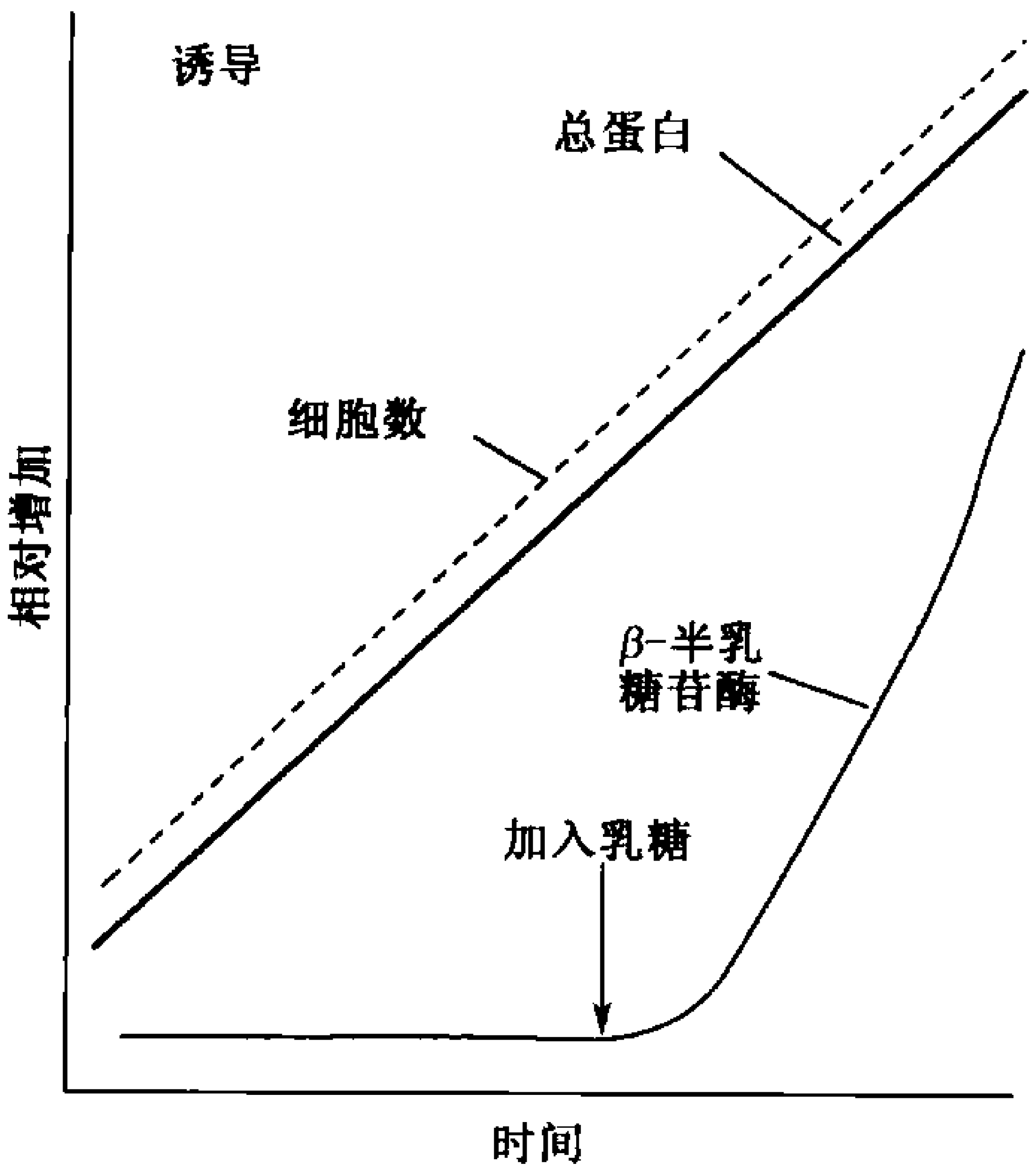


图 8.12 酶诱导。培养基中加入乳糖后，诱导了β-半乳糖苷酶合成，但总蛋白质的合成不受影响。

起始酶诱导的物质叫诱导物（inducer），阻遏酶合成的物质叫辅阻遏物（corepressor）。这些物质通常为小分子，统称为效应物（effector）。不是所有的诱导物和辅阻遏物都是相关酶的底物或终产物。例如，这些物质的类似物也可以起到诱导或阻遏作用。例如，异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）是β-半乳糖苷酶的诱导物，但不是这个酶的水解底物。实际上，诱导物和辅阻遏物通常是细胞的正常代谢物。β-半乳糖苷酶是乳糖操纵子（lac operon）基因编码的 3 个酶其中之一，实际上它的诱导物并不是乳糖而是其结构类似物异乳糖，这是细胞以乳糖为底物衍生而来的。

阻遏和诱导机制

诱导物和辅阻遏物是如何通过特殊方式影响转录呢？它们间接与特异性 DNA 结合蛋白结合，从而影响转录。以酶阻遏为例（图 8.11），辅阻遏物（此处为精氨酸）与细胞中存在的专一性阻遏蛋白相结合，形成精氨酸抑制子（图 8.13）。这种阻遏蛋白本身是一种变构蛋白（见 8.2 节和 8.4 节），当辅阻遏物与它结合时，它的构象就会发生改变。

阻遏蛋白通过与辅阻遏物结合而被激活，进而与基因启动子附近的 DNA 特殊区域——操纵子区（operator region）结合（见 7.13 节）。操纵基因区，是指以连续的方式线性排列在单一启动子控制下的一系列基因。在一个操纵子内的所有基因作为一个转录单位转录出一条 mRNA。操纵子位于启动子的下游（图 8.13），启动子是 mRNA 合成的起始位点。如果阻遏物结合在操纵子上，就会抑制 RNA 聚合酶与 DNA 的结合以及该酶向下游的移动，从而物理性地抑制转录。因此在操纵子内基因编码的多肽就无法合成。如果 mRNA 是多顺反子（见 7.13 节），那么由这条 mRNA 编码的所有多肽都将被抑制。

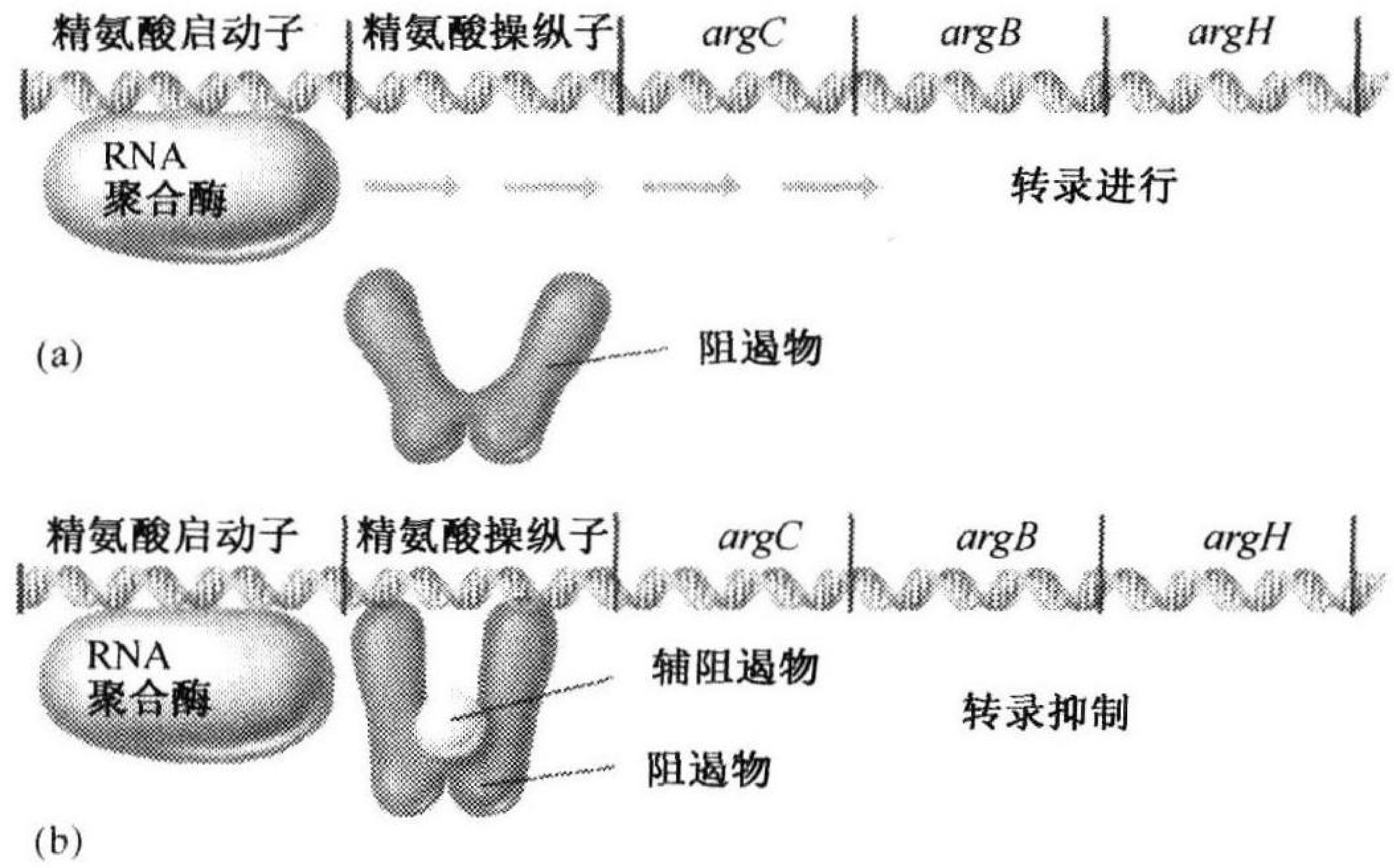


图 8.13 以精氨酸操纵子为例的酶阻遏过程。(a) 由于阻遏物不能与操纵子结合，使操纵子可以转录。(b) 当辅阻遏物（小分子）与阻遏物结合后，阻遏物就可结合到操纵子上，从而抑制转录，该基因编码的 mRNA 和蛋白质就不能合成。以 *argCBH* 操纵子为例，阻遏物是精氨酸阻遏物，辅阻遏物是精氨酸。

酶的诱导也可被阻遏物控制。在诱导物不存在时，特异性的阻遏蛋白是有活性的，可以完全抑制转录。当加入诱导物时，诱导物与阻遏蛋白结合，而使阻遏蛋白失去活性。此时阻遏被解除，转录开始进行（图 8.14）。

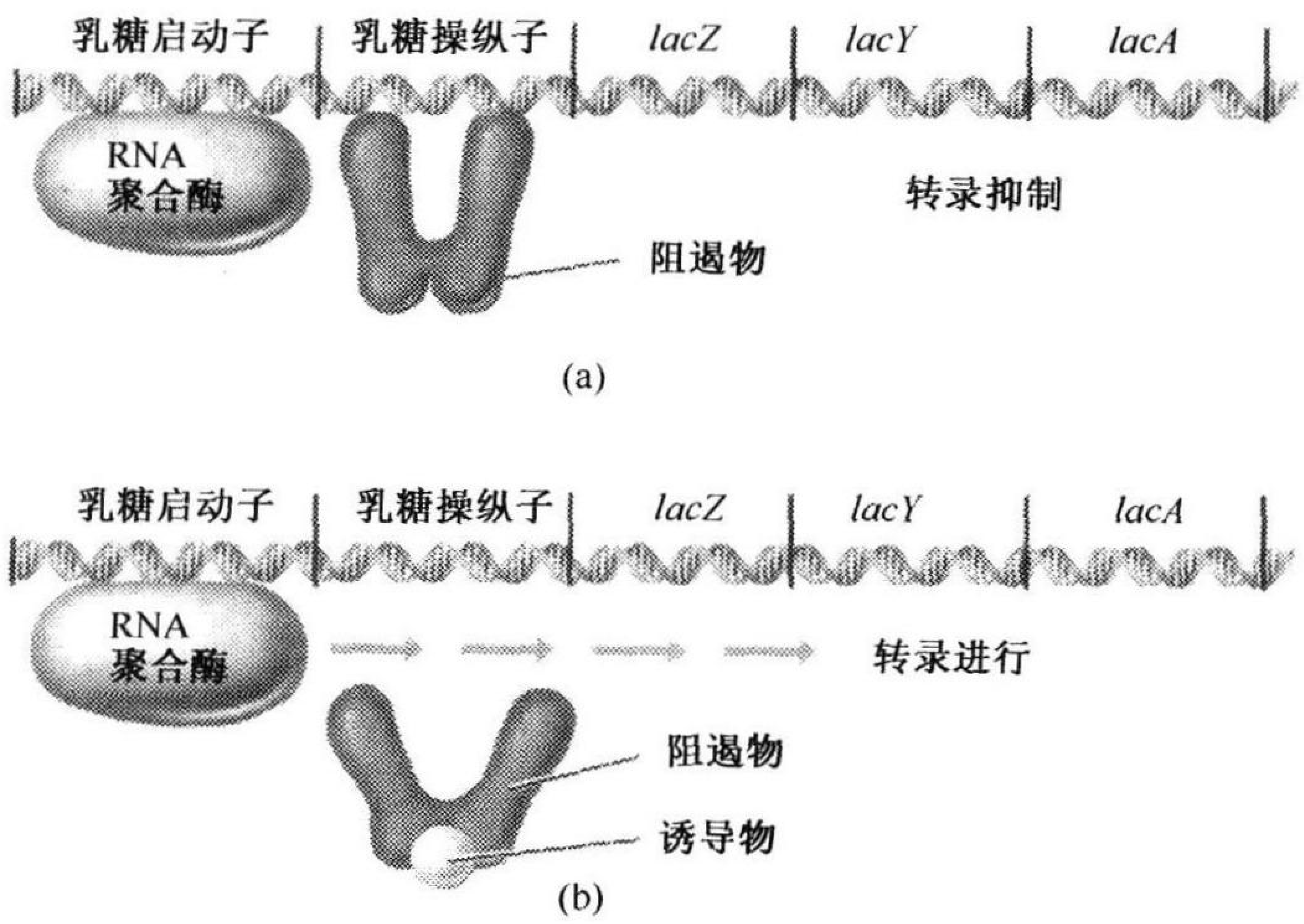


图 8.14 以乳糖操纵子为例的酶诱导过程。(a) 阻遏蛋白结合在操纵子区，阻止 RNA 聚合酶作用。(b) 诱导物分子结合到阻遏物上使其失活，并从操纵子上解离下来，RNA 聚合酶开始转录，操纵基因的 mRNA 合成。以乳糖操纵子为例，阻遏物是乳糖阻遏物，诱导物是异乳糖。

所有涉及阻遏物的调控系统都具有相同的基本机制：mRNA 的合成被具有活性的特异阻遏蛋白所阻遏，这些阻遏蛋白本身又受特异性小分子诱导物和辅阻遏物的调节。上述阻遏物作用是抑制，所以涉及阻遏物的调控称为负控制。

概念检查

细胞中酶量的调节可以通过增加（诱导）或者减少（阻遏）编码这个酶 mRNA 的量来实现。这种转录调控涉及结合到 DNA 上的变构调控蛋白。转录负控制中，调节蛋白称为阻遏物，它的作用是抑制 mRNA 合成。

◆ 负控制名称的由来?

◆ 阻遏物如何抑制特异性 mRNA 的合成?

8.6 转录的正控制

在转录负控制中，调控元件阻遏蛋白阻遏了 mRNA 的合成。相反，在转录正控制中调控蛋白激活 RNA 聚合酶，因此称之为正控制（positive control）。在大肠杆菌中，分解麦芽糖的反应就是一个典型正控制的例子。

大肠杆菌中麦芽糖分解机制

在大肠杆菌中，只有在培养基中加入麦芽糖时，才能合成麦芽糖利用酶。这些酶的表达方式与图 8.12 中 β-半乳糖苷酶的合成类似，不同的是影响基因表达的是麦芽糖而不是乳糖。麦芽糖降解酶的合成是受正控制的，需要有活性的激活蛋白（activator protein）存在，而不是像乳糖操纵子那样受负控制。

麦芽糖激活蛋白（maltose activator protein）必须先结合效应物麦芽糖后才能结合到 DNA 上，随后促使 RNA 聚合酶开始转录（图 8.15）。与阻遏物一样，激活物也特异性地与特定的 DNA 序列结合。但是 DNA 上激活蛋白结合位点的区域不被称为操纵基因（图 8.13 和图 8.14），而是称为激活蛋白结合位点（activator-binding site；图 8.15）。然而，激活蛋白结合位点控制的基因仍被称为操纵子。

激活蛋白的结合

在负调控中，阻遏物结合到操纵基因上抑制转录。激活蛋白如何发挥作用呢? 正控制操纵子的启动子所具有的核苷酸序列与保守序列不是紧密匹配（图 7.27）。因此，即使有适合的 σ 因子存在，RNA 聚合酶也很难识别这些启动子。

激活蛋白与 DNA 结合后，将有助于 RNA 聚合酶识别启动子，开始转录。例如，激活蛋白通过使 DNA 弯曲改变了 DNA 的结构（图 8.16），使得 RNA 聚合酶能与启动子正确结合，起始转录。另外，激活蛋白也可直接与 RNA 聚合酶作用。激活蛋白结合位点可以很接近启动子（图 8.17a），也可以在距离启动子几百个碱基对的位置。在这种情况下，DNA 必须弯曲成环状才能使激活剂与 RNA 聚合酶接触（图 8.17b）。

大肠杆菌中的很多基因启动子是受正控制的，也有很多启动子受负控制。此外，有许多操纵子具有一个受多种类型控制的启动子，或有一个以上各自具有自身控制系统的启动子。因此，图 8.13～图 8.17 显示的并不是所有操纵子的类型。事实上在所有原核生物中普遍存在着复合型控制，因此它们的调控相当复杂。

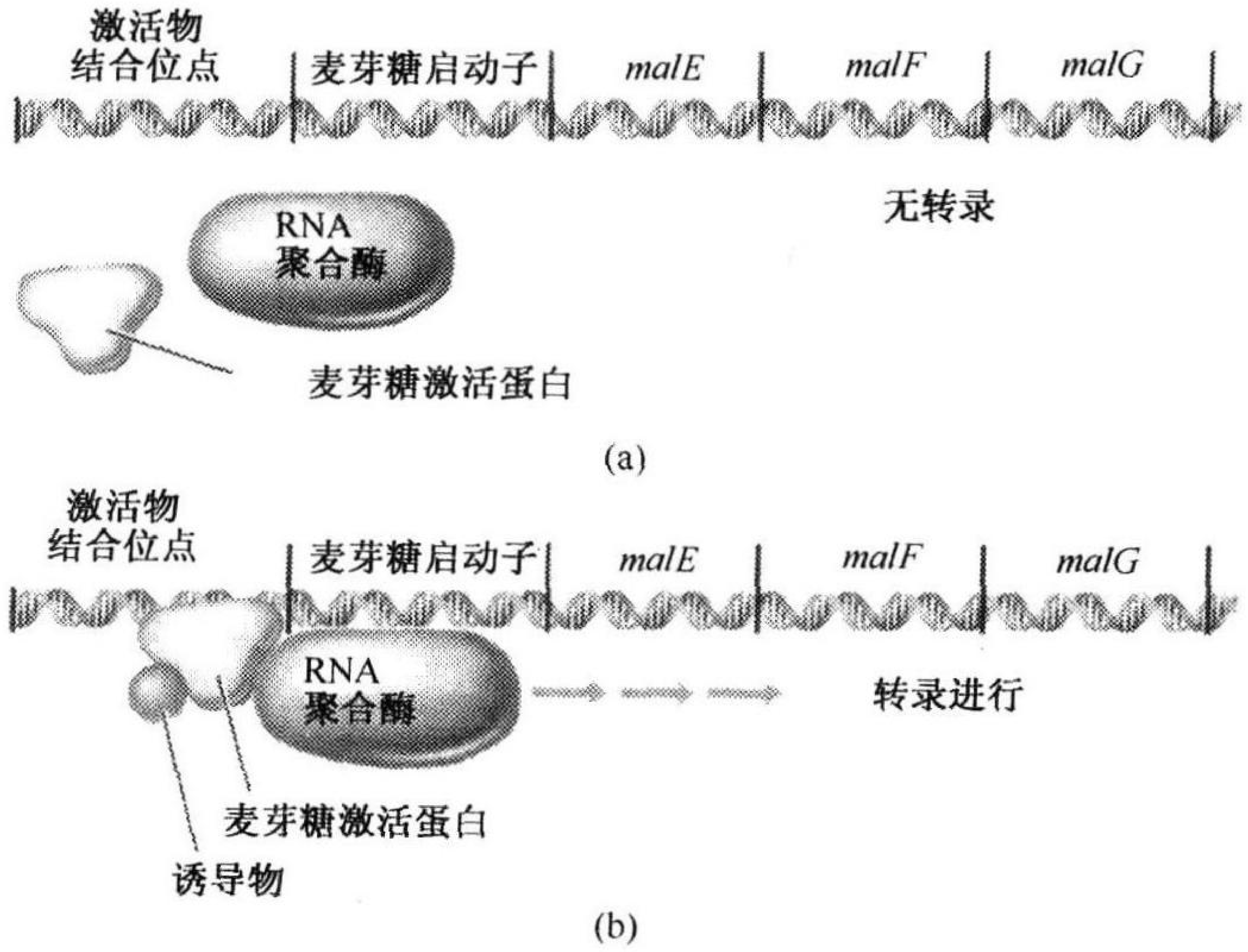


图 8.15　以麦芽糖操纵子为例的酶诱导正控制。(a) 诱导物不存在时，激活蛋白和 RNA 聚合酶都不能结合到 DNA 上。(b) 诱导物分子与激活蛋白结合后，激活蛋白就可结合到激活蛋白结合位点上，进而使 RNA 聚合酶结合到启动子上起始转录。在 *malEFG* 操纵子中，激活蛋白是麦芽糖激活蛋白，诱导物是麦芽糖。

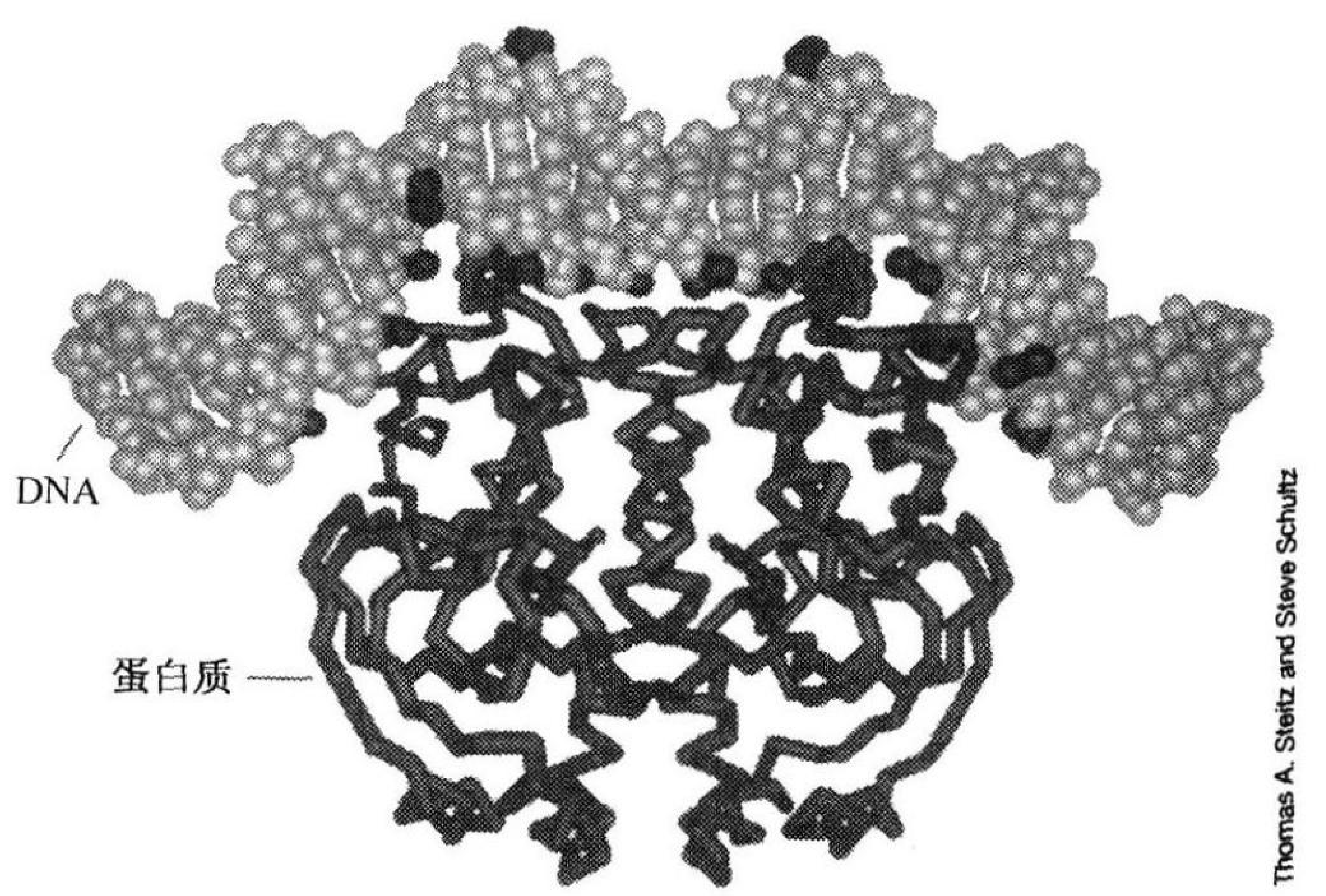


图 8.16　正调节蛋白与 DNA 相互作用的计算机模型。此图显示了环状 AMP 结合蛋白 (CAP 蛋白，见 8.7 节)，这是一个控制多个操纵子的调节蛋白。它的 α-碳骨架用蓝色和紫色标出。此蛋白与 DNA 双螺旋（黄色和浅蓝色标出）结合，使 DNA 显著弯曲。

操纵子与调节子

在大肠杆菌中，参与麦芽糖利用的基因在几个操纵子内，遍布在染色体上。每个基因都具有一个激活蛋白结合位点，可结合一个麦芽糖激活蛋白。因此，麦芽糖激活蛋白实际上控制着一个以上的操纵子。当一个以上的操纵子在同一调节蛋白控制下，这些操纵子就构成了一个调节子 (regulon)。所以，麦芽糖利用酶是由麦芽糖调节子 (maltose regulon) 编码的。

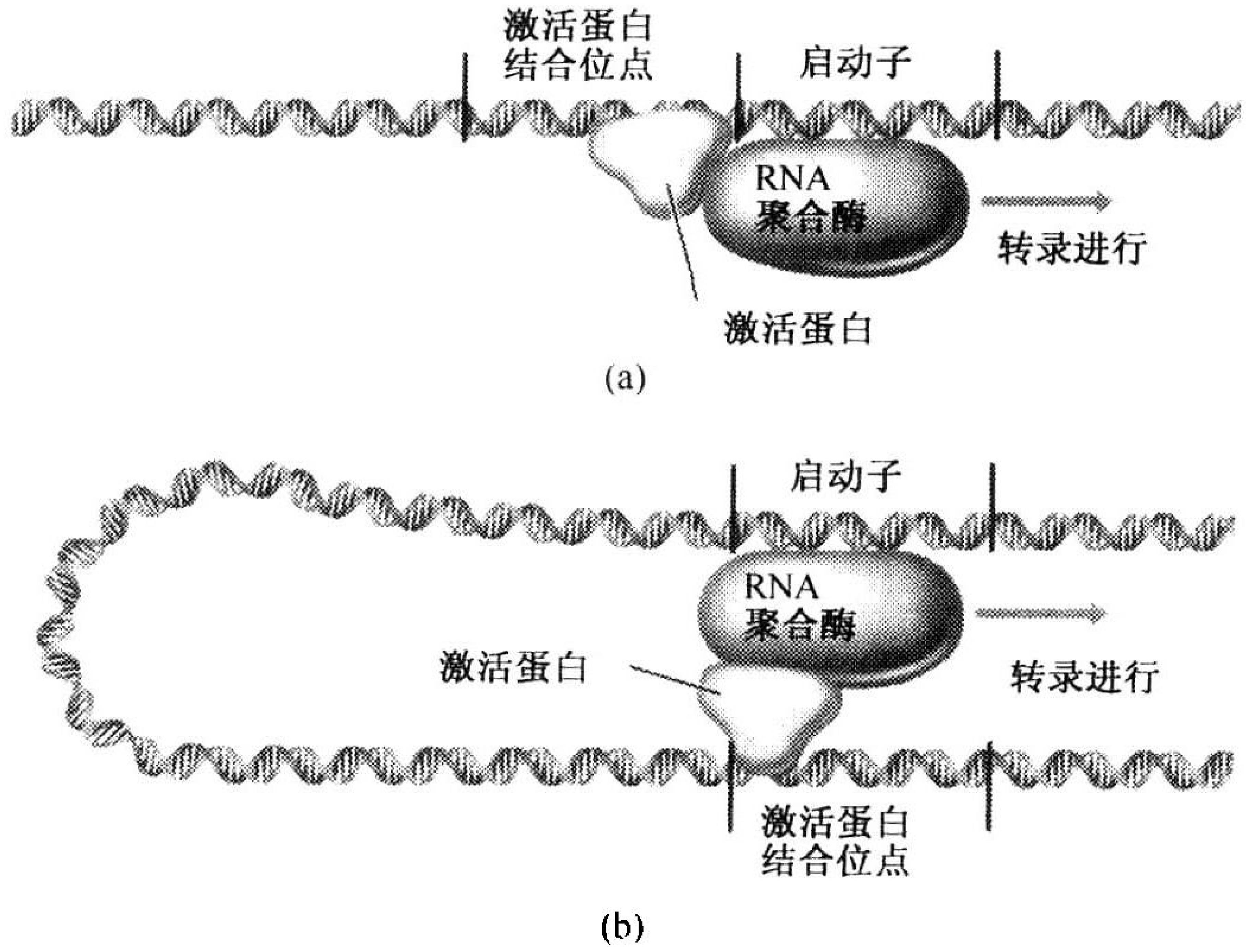


图 8.17 激活蛋白与 RNA 聚合酶相互作用。（a）激活蛋白结合位点在启动子附近。（b）激活蛋白结合位点距离启动子几百个碱基对。在此种情况下，DNA 必须弯曲成环状才能使激活剂与 RNA 聚合酶接触。

调节子也适用于负控制的操纵子。如精氨酸合成酶（见 8.5 节）是由精氨酸调节子编码的，其中的操纵子都是由精氨酸阻遏蛋白（图 8.13 中仅显示了一种精氨酸操纵子）控制的。但无论是激活还是阻遏，在调节子的控制中，特异性 DNA 结合蛋白只结合在它控制的操纵子上，而不影响其他操纵子。

概念检查

转录正调节因子称为激活蛋白。它们结合在 DNA 的激活蛋白结合位点上，激活转录。与阻遏物一样，激活蛋白也要被效应物修饰才具有活性。在酶诱导的正控制中，效应物启动激活蛋白的结合，进而激活转录。

◆ 比较激活蛋白和阻遏蛋白的活性。

◆ 操纵子和调节子的区别。

Ⅳ 全局调控机制

有机体通常需要同时调节许多不相关基因，以对环境变化做出反应。通过调节多个不同基因的表达来对环境信号做出应答的调控机制称为全局调控系统（global control system）。乳糖操纵子与麦芽糖操纵子都是对全局调控做出的应答。因此我们仍从乳糖操纵子入手来学习全局调控。

8.7 全局调控和乳糖操纵子

我们先前讨论的正负控制均没有考虑到细胞生活的环境中含有几种都能被细菌利用的碳源，如大肠杆菌可以利用很广的碳源。当含有葡萄糖在内的多种碳源存在时，大肠杆菌是同时利用，还是只利用一种呢？答案是葡萄糖总是被优先利用。当存在可以利用的碳源葡萄糖时，再去诱导其他糖的分解酶合成，显然是浪费。全局调控机制——分解代谢物阻遏（catabolite repression），以确保细胞不浪费能量。

分解代谢物阻遏

在分解代谢物阻遏中，当细胞在含有葡萄糖的培养基中生长时，各种与葡萄糖初级代谢无关酶的合成就会受到抑制。由于葡萄糖是第一个引起此现象的底物，因此，分解代谢物阻遏也称为葡萄糖效应（glucose effect）。在一些有机体内，除葡萄糖外的其他碳源也可以引起分解代谢物阻遏，关键在于引起其他能源物质代谢阻遏的底物必须是更易利用的碳源。在这种情况下，分解代谢物阻遏使得机体首先利用最易利用的碳源和能量。

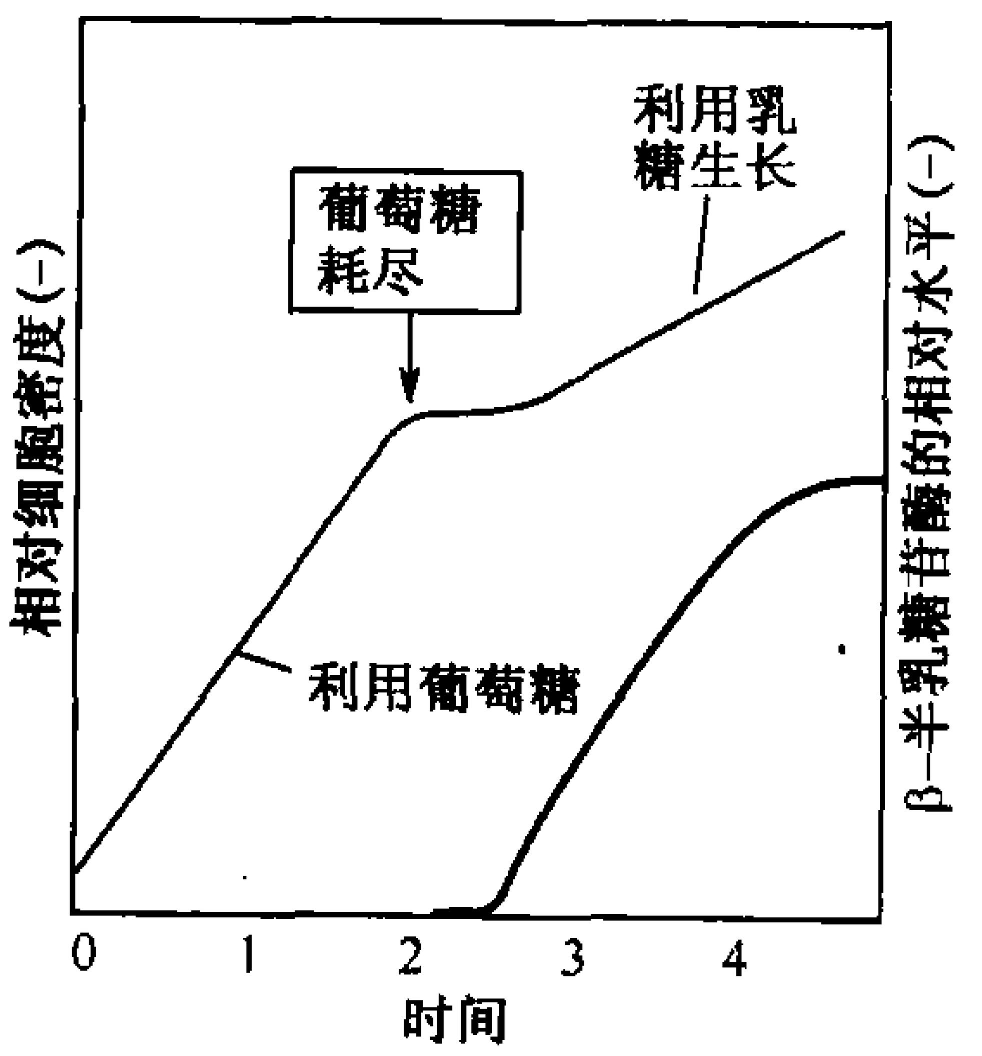


图 8.18　在葡萄糖和乳糖混合体系中的双峰生长。葡萄糖抑制了β-半乳糖苷酶的合成。当葡萄糖耗尽时出现一个生长停滞期，直到β-半乳糖苷酶合成后才能利用乳糖生长，但是生长率减慢。

分解代谢物阻遏可以引发第二个对数生长期，称为双峰生长（diauxic growth）。如果两种可以被细胞利用的能源同时存在时，在双峰生长中，机体首先选择最易利用的能源，随后出现一段停滞期，接着在另一种能源上恢复生长。图 8.18 中以大肠杆菌在含有葡萄糖和乳糖的复合培养基中的生长为例阐明双峰生长。

乳糖利用所需的β-半乳糖苷酶是可以被诱导的（图 8.12 和图 8.14），但是它的合成也要受分解代谢物阻遏调控。因此，只要有葡萄糖存在，β-半乳糖苷酶就不能合成，乳糖也就不能被利用。但当葡萄糖耗尽时，分解代谢物阻遏现象被解除，在一个短暂的停滞期后，β-半乳糖苷酶开始合成，细胞在含有乳糖的培养基上生长。图 8.18 显示细胞在含有葡萄糖培养基中的生长速率比在含有乳糖培养基中的生长速率快。虽然葡萄糖和乳糖都是大肠杆菌生长所需的较好能源，但是葡萄糖是其所有碳源中最易代谢的。因此，在以葡萄糖为底物时生长最快。

环式 AMP 与 CAP

分解代谢物阻遏是如何发挥作用的？分解代谢物阻遏涉及激活蛋白对转录的控制。因此，是一种正控制（见 8.6 节）。在分解代谢物阻遏酶的例子中，只有在分解代谢物激活蛋白（catabolite activator protein，CAP）与 DNA 结合后，RNA 聚合酶才能与 DNA 结合。CAP 是一种别构蛋白，它首先与一个称为环式腺嘌呤单磷酸（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）的小分子结合，发生构象改变后才能与 DNA 结合（图 8.16）。

无论是在原核生物还是高等生物体中，cAMP（图8.19）在各种调控系统中一直是关键分子。腺苷酸环化酶可将ATP转变成cAMP，葡萄糖可抑制这一转变过程，并且可促进cAMP向胞外的运输。当葡萄糖进入细胞后，cAMP水平降低，RNA聚合酶就不能与CAP-特异性操纵子的启动子区域结合。因此，当培养基中存在更易利用的碳源葡萄糖时，可导致分解代谢物阻遏，其直接原因是细胞中cAMP水平的下降。

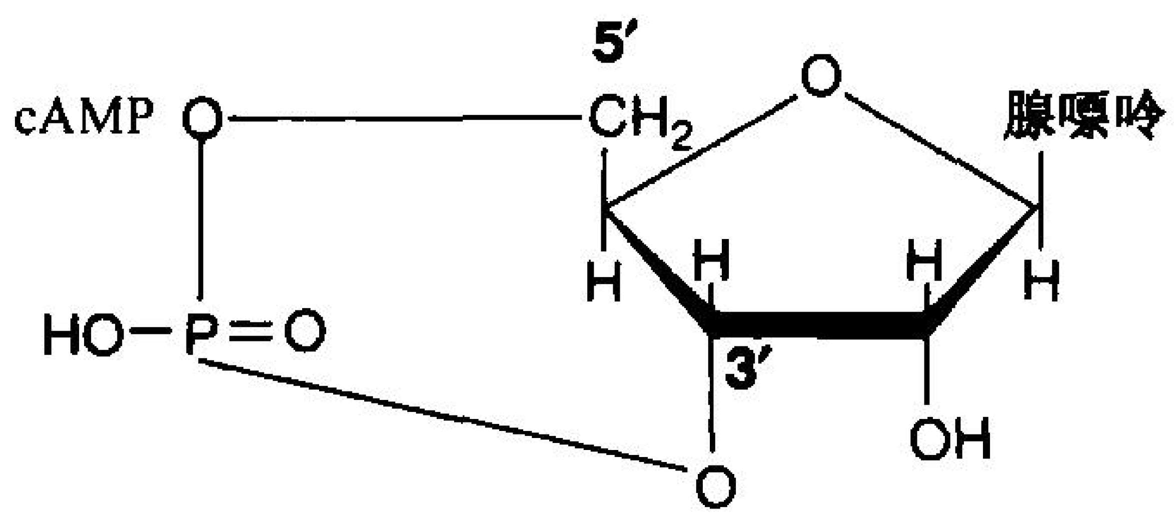


图8.19 环式AMP。腺苷酸环化酶将ATP转变成环式腺嘌呤单磷酸（cAMP）。

分解代谢物阻遏的全局概况

为什么分解代谢物阻遏被认为是一种全局调控机制呢？在大肠杆菌和其他生物体的例子中，它们以葡萄糖为基础碳源，只要有葡萄糖存在，分解代谢物阻遏就会抑制其他所有受这一机制控制的分解代谢操纵子的表达，这将涉及多个操纵子。因此，这不仅影响乳糖分解，而且还影响麦芽糖和许多其他糖的分解，以及大多数大肠杆菌可利用的碳源和能源的代谢。

我们以乳糖操纵子为例，了解整个调控图中的分解代谢物阻遏。乳糖操纵子的整个调控区在图8.20中显示。乳糖基因的转录必须满足以下两点：①cAMP的水平必须足够高，才能使CAP蛋白与CAP结合位点结合（正控制）；②必须有乳糖存在，才能使乳糖阻遏物不能结合到操纵基因上，抑制转录（负控制）。这两点一旦具备，细胞中又检测不到葡萄糖，而有乳糖存在时，乳糖操纵子就开始转录。

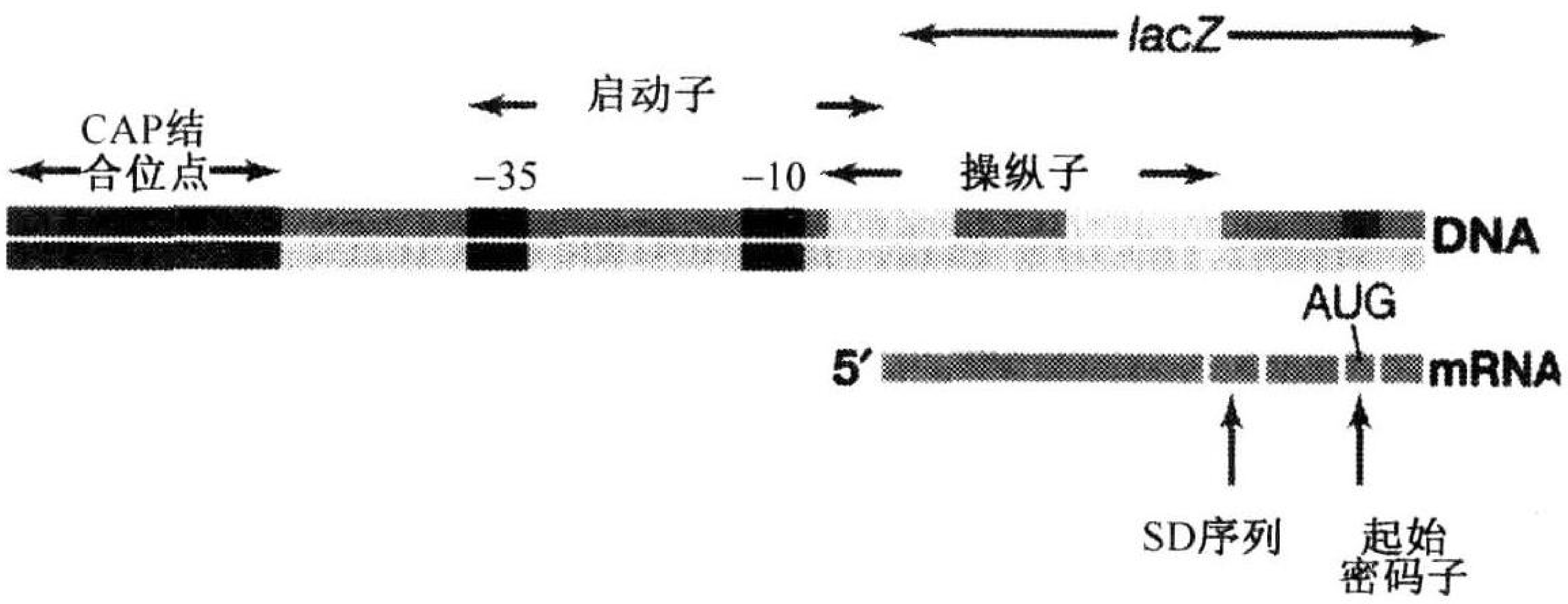


图8.20 乳糖操纵子的全局调控。此操纵子中的第一个结构基因*lacZ*编码可分解乳糖的β-半乳糖苷酶（图8.14）。操纵子中包含的另外两个基因也与乳糖代谢有关。操纵基因（阻遏物结合位点）的两部分是完全反向重复序列，CAP结合位点也含有不完全的反向重复序列，定位在DNA上的转录起始位点就是mRNA的5′端。启动子的一部分－35区和普里布诺框（pribnow box）也在图中显示（图7.30）。此外编码SD序列（Shine-Dalgarno sequence）的碱基对和起始密码子的定位也被给出。这两个序列是mRNA上的重要序列（见7.16节）。

概念检查

全局调控系统同时调控多个基因表达。分解代谢物阻遏是一种协助细胞有效利用碳

源的全局调控系统。乳糖操纵子受分解代谢物阻遏系统和它本身的特异性负控制系统的共同调控。

◆ 解释为什么分解代谢物阻遏包括激活蛋白。

◆ 解释为什么乳糖操纵子既是正控制又是负控制。

8.8 应急反应

自然界中的细菌细胞经常会遇到暂时的，但却是很明显的营养水平变化。由于这种条件很容易在实验室模拟，因此人们对大肠杆菌和其他一些原核生物在不同营养状态下，基因表达的“上调”和“下调”做了大量的研究工作。这些研究中，最典型的是由于氨基酸饥饿引起的调控。

从氨基酸过量到氨基酸量限制下调的结果是：即当培养物从丰富的复合培养基转移到只有单一碳源的限制培养基时，将导致核糖体 RNA 和 tRNA 的合成立即停止，这样就没有新核糖体产生，蛋白质和 DNA 的合成也减少，而新氨基酸的生物合成途径被激活（图 8.21a)。紧接着，各种新蛋白质开始合成，补充环境中缺乏的氨基酸，但这些合成仍是利用细胞中原有的核糖体。经过一段时间之后，rRNA 的合成又重新开始（此后为新核糖体），但是新的 rRNA 合成速率和细胞的生长速度都会有所降低。这个过程被称为应急反应（stringent response，或称应急控制），也是全局调控的又一个例子。

ppGpp 和应急反应机制

应急反应的信号是两个修饰的核苷酸，鸟苷四磷酸（guanosine tetraphosphate，ppGpp）和鸟苷五磷酸（guanosine tentraphosphate，pppGpp；图 8.21b)。在大肠杆菌中，这些核苷酸称为警报素（alarmone)。当环境从氨基酸过量迅速转为氨基酸饥饿时，这些核苷酸在细胞中迅速积累。警报素是由一种特殊的 RelA 蛋白酶合成的，ATP 作为磷酸的供体（图 8.21b，c)。RelA 与核糖体 50S 亚基结合（表 7.6)，在氨基酸饥饿时，RelA 被来自核糖体的信号激活，这些信号是核糖体功能丧失时产生的。细胞在氨基酸饥饿时产生大量空载 tRNA，这些 tRNA 与核糖体结合后，抑制了核糖体功能，激活了 RelA，从而由 RelA 催化合成 ppGpp/pppGpp（图 8.21c)。

警报素 ppGpp 和 pppGpp 具有全局调控作用。它们能够干扰由 RNA 聚合酶起始的转录，从而强烈地抑制 rRNA 和 tRNA 的合成。另一方面，警报素还能激活某些氨基酸合成的操纵子，以及各种产生大分子前体的分解代谢操纵子。相反，环境中氨基酸过量时，编码合成蛋白质的操纵子就会关闭。应急反应还会对细胞产生许多其他的影响，如抑制新一轮 DNA 合成的起始、膜脂合成和细胞分裂过程等。

应急反应可以被看成是细胞在氨基酸量受限制时对生物合成的一种调节机制。通过这种调节，细胞在合成和分解代谢间形成了新的平衡。对大多数原核生物来说，自然界中的营养物质是不断变化的，因此，像应急反应这样的全局调控机制，将使细胞的代谢状态与环境中可利用的氨基酸达到平衡，这很可能增加了它们在自然界中生存的竞争力。

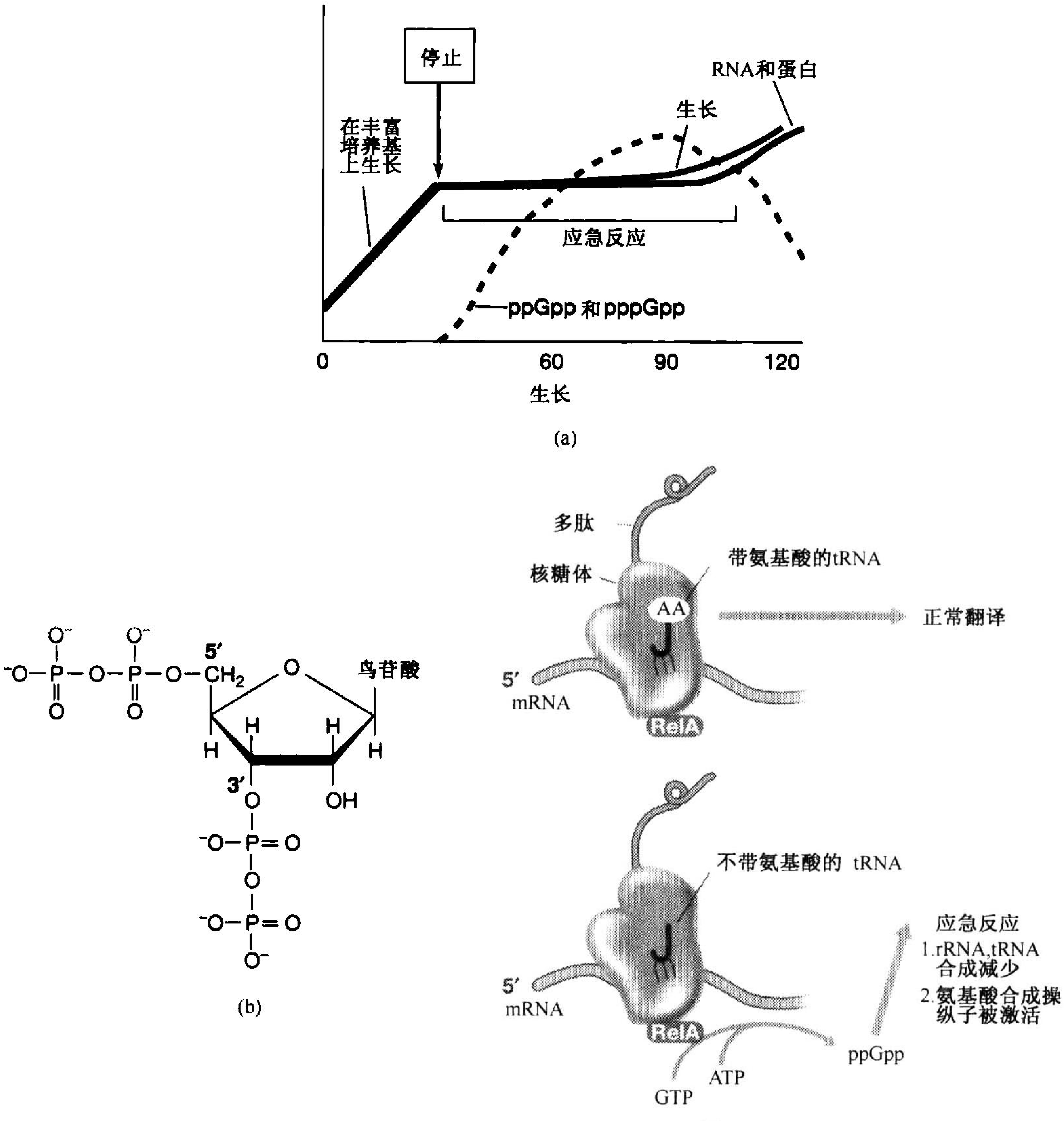


图 8.21 应急反应。(a) 当营养条件下调时，rRNA、tRNA 和蛋白质的合成暂时停止。一段时间后，生长又可恢复，但是新的生长率比应答之前低。(b) 鸟苷四磷酸 (ppGpp) 的结构，它是应急反应的开关。(c) ppGpp 的合成。正常翻译时（上图），需要带氨基酸的 tRNA；当氨基酸饥饿时，空载 tRNA 结合到核糖体上（下图），终止了核糖体活性，激活了 RelA 蛋白，从而合成 ppGpp。

概念检查

应急反应是一种由氨基酸饥饿而启动的全局调控机制。警报素 ppGpp 和 pppGpp 由 RelA 产生，这是一个监控核糖体活性的蛋白质。应急反应使细胞在蛋白质产生和蛋白质需求之间保持平衡。

◆ 在应急反应中哪些基因被激活？为什么？

◆ 警报素是如何合成的？

8.9 其他全局调控网络

在第 8.7 节中我们讨论了大肠杆菌中分解代谢物阻遏，在第 8.8 节中我们讨论了应急反应。这两种都属于全局调控。但在大肠杆菌（也许在所有原核生物中都有）中还有几种其他全局调控系统，其中一些在表 8.1 中显示。

表 8.1 大肠杆菌中已知的全局调控系统[a]

系统	信号	调控蛋白的基础活性	调控基因数
有氧呼吸	O_2的存在	抑制蛋白(ArcA)	50＋
无氧呼吸	没有 O_2	激活蛋白(FNR)	70＋
代谢抑制	环式 AMP 的量	激活蛋白(CAP)	300＋
热休克	温度	更替因子(σ^{32})	36
氮利用	NH_3的限制	激活蛋白(NR1)/更替因子(σ^{54})	12＋
氧化	氧化剂	激活蛋白(OxyR)	30＋
SOS 应答	DNA 损伤	抑制蛋白(LexA)	20 ＋

a. 大多数全局调控系统的调控都是复杂的。一个调节蛋白可以行使多种功能。例如，有氧呼吸的调节蛋白对于许多启动子是阻遏物，但对另一些则是激活子；然而，无氧呼吸的调节蛋白对于许多启动子是激活蛋白，但对另一些则是阻遏物。调控也可以是间接的或需要一个以上的调节蛋白。这些调节蛋白属于双组分调控系统的成分（见 8.12 节）。许多基因被一个以上的全局调控系统调控（见 10.4 节讨论的 SOS 反应）。

全局调控系统可能涉及一个以上的调节子（见 8.7 节）。受同一调节蛋白调控的一组基因称为调制子（modulon)，这些基因可能来自不同的调节子（因此存在至少一种调控类型）。对同一环境信号做出反应的一组基因称为刺激子（stimulon)，这些基因编码的蛋白质可能并不相关。表 8.1 显示了一些广泛的全局调控系统的例子。

更替 σ 因子

属于全局调控系统的基因并不都是仅通过简单阻遏物或激活物的结合来进行调控的。有一些是通过更替 σ 因子（sigma factor）来实现调控的（表 8.2)。在这些情况下，由于每个可更替的 σ 因子仅能识别基因组中基因的特定区域（如调制子或刺激子)，所以细胞可通过改变这些 σ 因子的量和活性进行调控。

σ 因子是 RNA 聚合酶的亚单位，对启动子有识别作用（见 7.10 节）。大肠杆菌中的大多数基因需要 σ^{70}因子（上标 70 表示此蛋白质的大小为 70kDa）来实现转录，同时还需要如图 7.30 中所示的启动子。大肠杆菌中共有 7 种不同的 σ 因子，每一种 σ 因子可以识别不同的启动子序列（表 8.2)。其他细菌中也有这些 σ 因子的类似物。可以形成芽孢的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）有 14 种 σ 因子，其中有 4 种不同的 σ 因子与芽孢特异性基因转录有关（见 4.13 节）。

通过更替 σ 因子来控制转录的关键是要控制每种 σ 因子的合成和活性。每种 σ 因子在细胞中的含量，既可以通过转录调控，也可以通过控制细胞中特异性蛋白酶降解 σ 因子的速率来调控。此外，可更替 σ 因子的活性，也可被称为抗 σ 因子（anti-sigma factor）的蛋白质调控，使 σ 因子暂时失活，这是对环境信号变化反应的另一种形式（表 8.1)。

表 8.2 大肠杆菌中的σ因子

名称[a]	上游(−35)区识别序列[b]	功能
σ^{70}	TTGACA	是与正常生长相关的大多数基因的主要σ因子
σ^{54}	TTGGCACA	氮源同化
σ^{38}	CCGGCG	稳定期的主要σ因子,也与氧化和渗透反应基因相关
σ^{32}	TNTCNCCTTGAA[c]	热休克反应
σ^{28}	TAAA	与鞭毛合成的基因相关
σ^{24}	GAACTT	对周质中错误折叠蛋白质应答
σ^{19}	AAGGAAAAT	与特异性铁转移基因相关

a. 名称的上标表示蛋白质的大小(kDa)。大多数因子还有其他名称,σ^{70}有时也被称为σ^{D};

b. 共有序列,见 7.10 节、7.11 节和图 7.30;

c. N,任意核苷酸。

热休克反应

大多数蛋白质相对比较稳定,一旦产生就可以行使功能直到细胞裂解。但有些蛋白质由于错误折叠等原因可以被细胞中的蛋白酶识别并降解。例如,在大肠杆菌中,σ^{32}因子通常在合成后的 1～2min 内就被降解。当细胞遇到环境温度急剧升高时(热休克),σ^{32}的降解被抑制。细胞中的σ^{32}大量存在,具有特异性启动子的操纵子被大量转录(表 8.2)。大肠杆菌中被σ^{32}控制的基因称为热休克基因(heat shock gene),它编码的热休克蛋白(heat shock protein)在热休克反应(heat shock response)中表达。

热休克蛋白可协助细胞从恶劣环境中恢复。它们不仅可以被高温所诱导,也可被细胞遇到的其他一些环境胁迫因子所诱导。例如,细胞暴露在一些高浓度化学物质中,如乙醇或者暴露在大剂量的紫外线下。

在大肠杆菌以及被研究的其他大多数原核生物中,存在 3 种热休克蛋白:Hsp70、Hsp60 和 Hsp10。大肠杆菌中的 Hsp70 就是 DnaK,这个蛋白质的功能是阻止新合成蛋白质的聚合,并稳定未折叠的蛋白质(见 7.17 节)。DnaK 在σ^{32}的降解中起着一定作用,它以反馈调节的形式控制正常环境下细胞中的σ因子量。但细胞处于环境胁迫时,DnaK 主要作用是挽救和修复蛋白,所以σ^{32}含量增加、热休克基因高水平转录。

大肠杆菌中 Hsp60 和 Hsp10 家族的主要代表是 GroEL 和 GroES。它们是催化纠正错误折叠蛋白的分子伴侣(molecular chaperone;见 7.17 节和图 7.40)。另一类热休克蛋白是几种蛋白酶,它们在细胞中的功能是除去变性的和不可逆聚集的蛋白质。热休克蛋白起源较早,并存在于所有细胞中。热休克蛋白特别是 Hsp70 的分子序列(见 14.9 节)已被用于真核细胞起源的研究。

当环境胁迫状态结束时,如温度下降,σ^{32}迅速被 DnaK 灭活,热休克蛋白的合成大量减少。由于热休克蛋白在细胞中具有重要作用,因此在正常生长环境下,细胞中仍存在少量热休克蛋白。然而在环境胁迫状态时,热休克蛋白能迅速合成,使细胞可以在高热、极端化学与物理环境中生存。在高热或者其他极端环境下,细胞会产生大量无活性蛋白,这些蛋白质或是重新折叠(在此过程中恢复蛋白质活性)或是降解释放出游离氨基酸为新蛋白质的合成提供原料。

冷休克

低温诱导的细胞胁迫也可诱导许多基因表达，但这些基因表达的不是 Hsp 蛋白，低温也阻止了核糖体的功能，触发了冷休克反应（cold shock response）。冷休克蛋白包括促旋酶、核酸酶和核糖体结合蛋白，它们能直接或间接与 DNA、RNA 及核糖体相互作用，从而减少大分子合成。由冷激诱导的蛋白质在细胞内能增加可混溶的溶质产生（见 6.14 节），从而有助于细胞质中分散冰的形成。如果环境温度接近冰点时，冰晶核蛋白就被合成，这一催化形成的冰晶格对细胞成分（如膜）的损伤比非晶形冰要小。

概念检查

细胞可通过更替 σ 因子控制多个调节子。这种控制只能识别特异启动子影响特定基因转录。其他全局信号包括热休克蛋白和冷休克蛋白可协助细胞抵抗温度的极端变化。

◆ 为什么细胞具有多种 σ 因子？

◆ 为什么热休克状态下诱导的蛋白质在冷休克状态下不需要？

8.10 群体感应

如前面提到的，全局调控系统使生物能同时调控多个基因，从而对环境信号做出反应。原核细胞还能对一个潜在“信号”做出反应，这个潜在信号就是它生存环境中同种细胞其他个体的存在。一些原核细胞可对它周围同种细胞密度做出反应，进行一系列调控。这种调控称为冷休克蛋白（quorum sensing）（这种感应中的群体指“足够的数量”）。

群体感应机制

群体感应是一种确保某种细胞只有在达到一定数量时，才能发生特异性生物反应的机制。如单个致病菌分泌的毒素对宿主无影响，细胞产生这种毒素是浪费能源。但是，如果致病菌先达到高的群体密度，然后毒素基因才表达，就会成功导致疾病。

群体感应在革兰氏阴性菌中普遍存在。具有这种调控机制的细菌都能合成特异性酰基高丝氨酸内酯（homoserine lactone；AHL；图 8.22a）。该分子可以自由扩散到细胞外。因此，只有当周围细胞都产生 AHL 时，细胞内 AHL 才能达到足够高的浓度。这种特异性 AHL 分子可作为诱导子与激活蛋白结合，启动特异性基因转录（图 8.22b）。

群体感应最初是通过研究细菌生物发光机制而发现的。一些原核细胞如海洋细菌费氏弧菌（*Vibrio fischeri*），是以这种方式发光的（见 12.12 节和图 12.28）。图 8.23 显示了费氏弧菌菌落的生物发光现象。该菌细胞内有一种萤光素酶，在其催化反应过程中能够产生光。*lux* 操纵子编码生物发光相关蛋白质，它受 LuxR 激活蛋白的调控，当特异性费氏弧菌的 AHL［*N*-3-氧代己基高丝氨酸内酯（*N*-3-oxohexanoyl homoserine lactone）］达到足够高浓度时，*lux* 操纵子就会被诱导激活。AHL 是由 *luxI* 基因编码的蛋白质合成的。

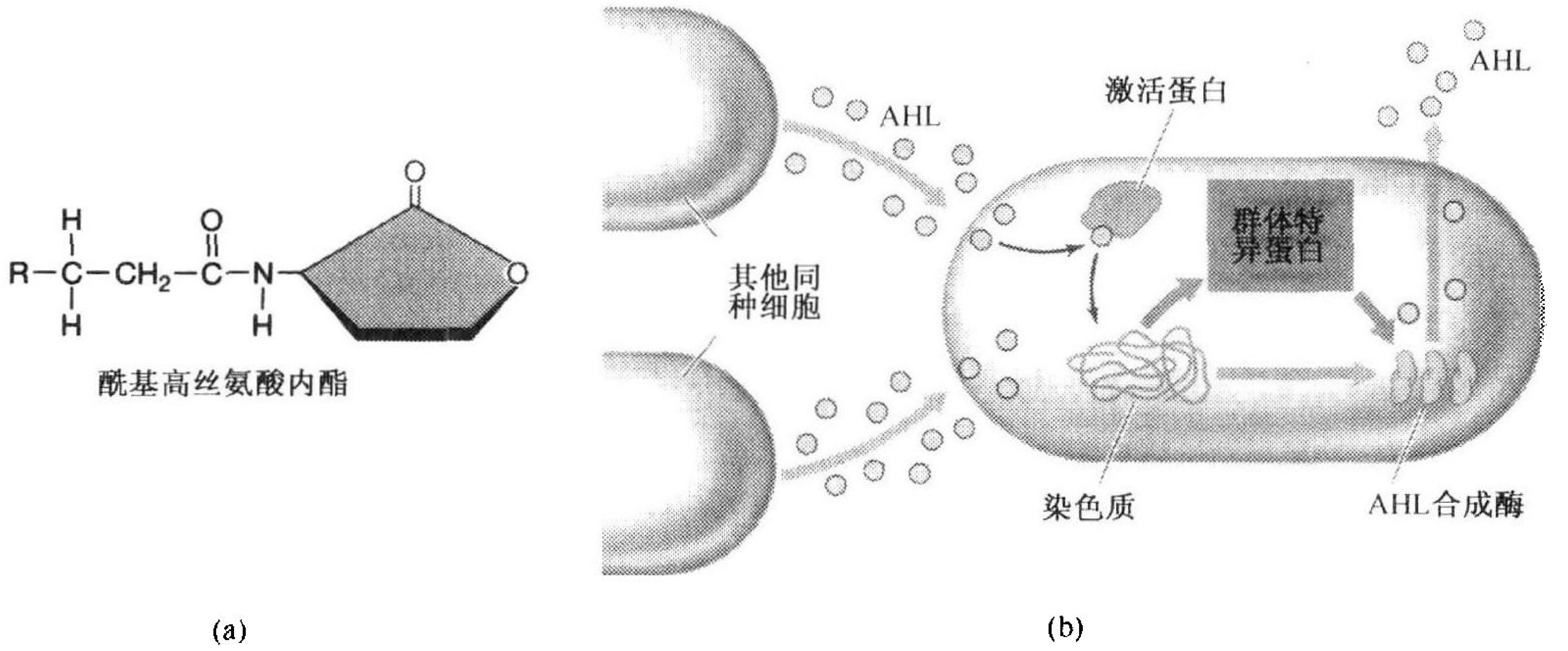


图 8.22 群体感应。(a) 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 的一般结构，不同的 AHL 都是由这个母体结构演变而来的，R 为酮基或羟基。(b) 可以产生群体反应的细胞内酰基高丝氨酸内酯合成酶基因的基础转录和翻译，这个酶可以产生细胞特异性的 AHL。当同种细胞达到一定数量后，AHL 的量迅速增加，并结合到激活蛋白上，激活群体特异性蛋白转录。

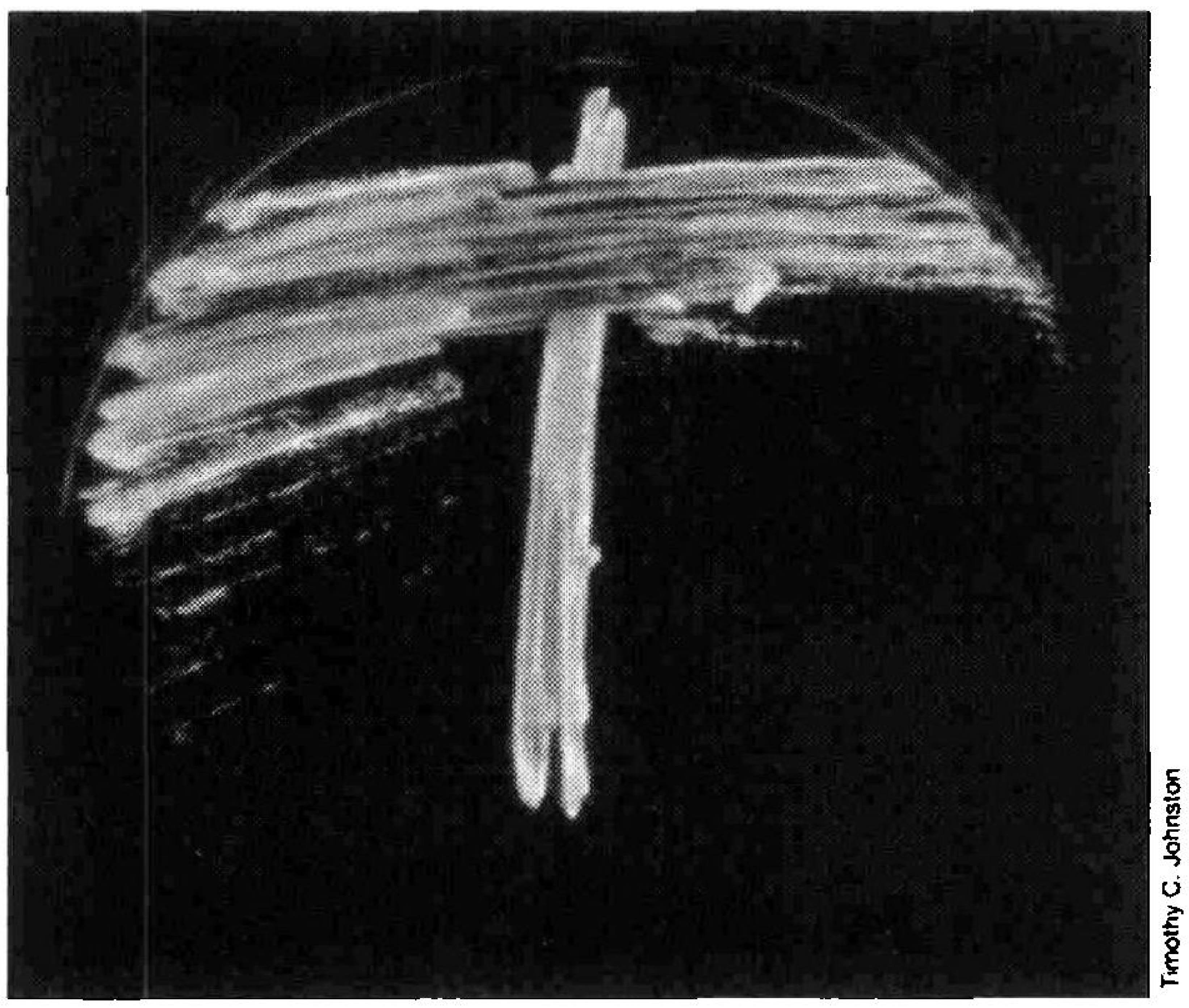


图 8.23 生物发光细菌产生萤光素酶 (见 12.12 节)。用划线的方式将费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 接种到琼脂平板培养基上，过夜培养。该照片是在暗室中利用细菌自身产生的光拍摄的。

群体感应实例

许多基因都受群体调控系统的控制，包括一些引起疾病的基因 (致病基因)。例如，在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中，当菌体密度足够高时，群体感应可引发大量不相关基因的表达。这些基因有助于铜绿假单胞菌的细胞由液体中自由悬浮生长转变为半固体基质 (也称为生物膜，biofilm) 中生长 (见 19.3 节)。这种生物膜是由铜绿假单胞菌产生的特殊多糖形成的，它能够增加菌体的致病性，并能防止抗生素的渗透。

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 致病性 (见 25.7 节和 26.9 节) 的一部

分是产生和分泌胞外肽，从而破坏宿主细胞或干扰免疫系统。编码这些毒性因子的基因由群体感应系统控制，是对菌体产生的肽（不只是 AHL）做出的反应。这些基因的调控是复杂的，有些包括调节 RNA 分子（regulatory RNA molecule）。虽然我们在这章只讨论蛋白质调控，但是调节 RNA 分子也是存在的（见 8.14 节）。金黄色葡萄球菌的群体感应系统中还涉及一些调节蛋白，这些蛋白质是双组分，即信号转导调控系统中的一部分。我们将在 8.12 节讨论这种调控。

人们已经在至少一种古生菌中发现了群体感应系统。在盐碱环境中生长的隐藏嗜盐碱球菌（*Natronococcus occultus*；一种需要高盐浓度和高 pH 的生物；见 13.3 节）能够在特异性 AHL 调控下合成胞外蛋白酶。这种调控确保了只有在细胞达到足够数量时，才能产生足够的胞外蛋白酶，并以一定的速率降解蛋白质。虽然这是目前已知的唯一一个存在于古生菌中的群体感应例子，但是估计其他古生菌也会存在这种群体感应，否则它们就不能在细胞达到足够数量时，激活有利于其生存的反应。

概念检查

群体感应使细胞可以监测环境中同种细胞的存在情况。群体感应包括特异性小分子的共享。一旦存在足够的信号分子，特异性基因表达就会被启动。

- 主要的群体感应信号分子有哪些？
- 就信号分子而言，假单胞菌和葡萄球菌的群体感应有什么区别？

V 其他调控机制

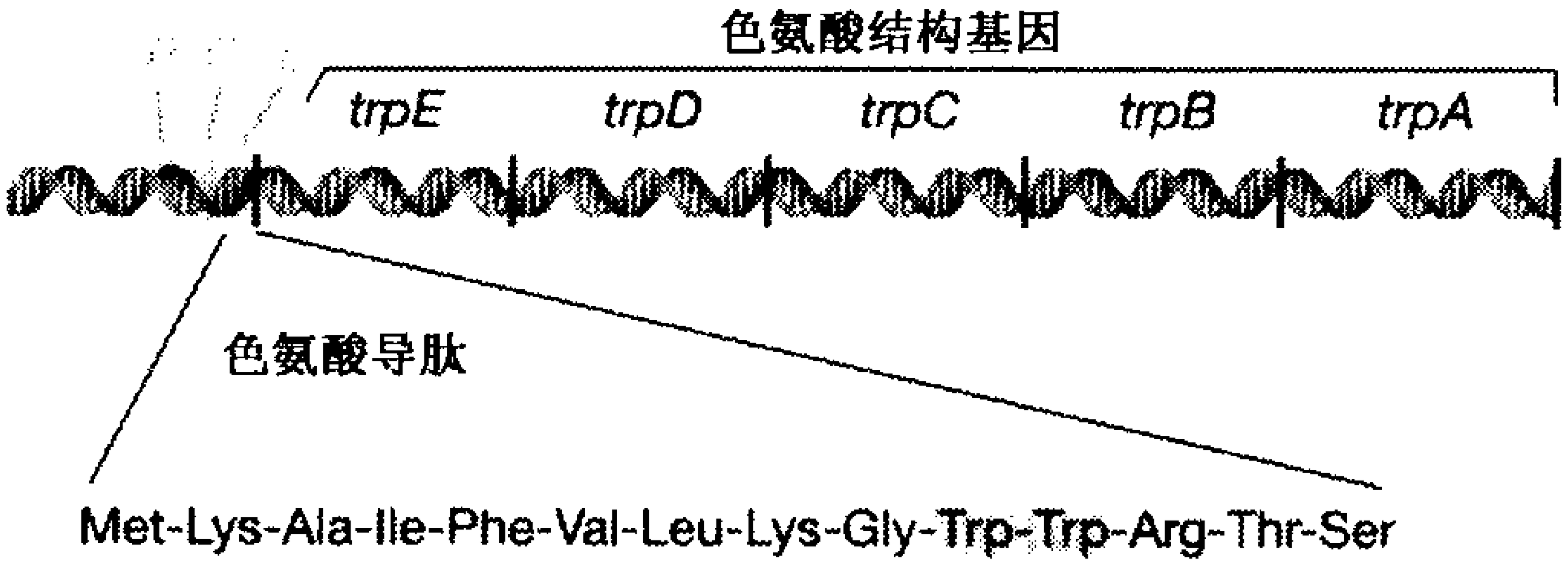
我们已经讨论了几种细胞调控基因转录的机制：阻遏物、激活物、更替 σ 因子、群体感应分子。除了上述几种外还有一些重要的调控机制我们将在本节讨论。

8.11 衰减作用

一些调控系统不以调节蛋白与 DNA 结合的方式来进行调控的。衰减作用（attenuation）就是这样的调控系统。在衰减作用中，调控发生在转录起始之后、终止前。也就是说衰减作用并不影响转录的起始，而是减少了操纵子完整转录产物的数量。革兰氏阴性菌对特定氨基酸生物合成基因的调控是衰减作用最好的例子。首先被研究的是大肠杆菌中的色氨酸操纵子（tryptophan operon）。

衰减作用与色氨酸操纵子

色氨酸操纵子包含 5 个与色氨酸合成相关的结构基因，在操纵子的起始部位是通用启动子和调控序列（图 8.24）。像许多操纵子那样，色氨酸操纵子具有多种调控方式。色氨酸合成途经中的第一个酶氨基苯甲酸合成酶（anthranilate synthase）是由 *trpD* 和 *trpE* 编码的一个多亚基酶，受色氨酸反馈抑制（见 8.2 节）。整个色氨酸操纵子的转录在负控制下进行（见 8.5 节）。



(a)

苏氨酸	Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly
组氨酸	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp
苯丙氨酸	Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

(b)

图 8.24 衰减作用和前导肽。在大肠杆菌中，色氨酸操纵子、色氨酸和其他前导肽的结构。(a) 色氨酸操纵子的排列。前导序列 (L) 编码一个短肽，在它末端附近包含两个色氨酸残基(接丝氨酸残基后是终止密码子)。启动子用 P 表示，操纵基因用 O 表示。*trpE* 到 *trpA* 表示编码色氨酸生物合成酶的结构基因。(b) 其他一些氨基酸生物合成操纵子的前导肽序列。由于异亮氨酸是以苏氨酸为底物合成的，因此它是苏氨酸前导肽中的重要成分。

但是除了启动子 (P) 和操纵基因 (O) 外，在操纵子中还存在一段序列称为前导序列 (leader sequence)。该序列编码一个多肽，其末端序列含有串联的色氨酸密码，它具有衰减子 (attenuator) 的功能 (图 8.24)。

调控的基本过程是这样的。如果细胞中有大量的色氨酸，那么携带色氨酸的 tRNA 就会很充足，前导肽就会被合成。反之，如果色氨酸缺乏，富含色氨酸的前导肽就不能被合成。前导肽的合成终止了色氨酸操纵子结构基因的转录。相反，如果前导肽的合成被色氨酸缺乏所抑制，色氨酸结构基因的转录就可以进行。

衰减作用机制

前导肽的翻译是如何调控下游色氨酸基因转录的呢？在原核细胞中转录和翻译是同步进行的，一旦 mRNA 从 DNA 上释放出来，核糖体就能与之结合起始翻译 (图 7.39)。也就是说，当下游 DNA 序列仍在转录时，前面已转录出来的序列就开始翻译了 (图 8.25)。

衰减作用的发生 (转录终止) 是由于新合成的 mRNA 上的某部分折叠成唯一的茎环结构，从而抑制了 RNA 聚合酶的活性。mRNA 的茎环结构是由临近核苷酸互补配对形成的。如果色氨酸过量，核糖体就开始翻译前导序列，直至遇到前导终止密码子。然后前导序列 RNA 其余部分呈茎环结构，即一个转录终止位点，该终止位点后，是实际引起转录终止的富含尿嘧啶序列 (图 8.25)。

如果色氨酸缺乏，很明显细胞需要转录编码色氨酸合成酶的基因。在前导序列转录时，由于缺乏携带色氨酸的 tRNA，核糖体在色氨酸密码子处停止。这可使茎环结构发生改变 (在图 8.25 中的 2 和 3 位点)，这个新形成的茎环不是转录终止的信号。相反，它抑

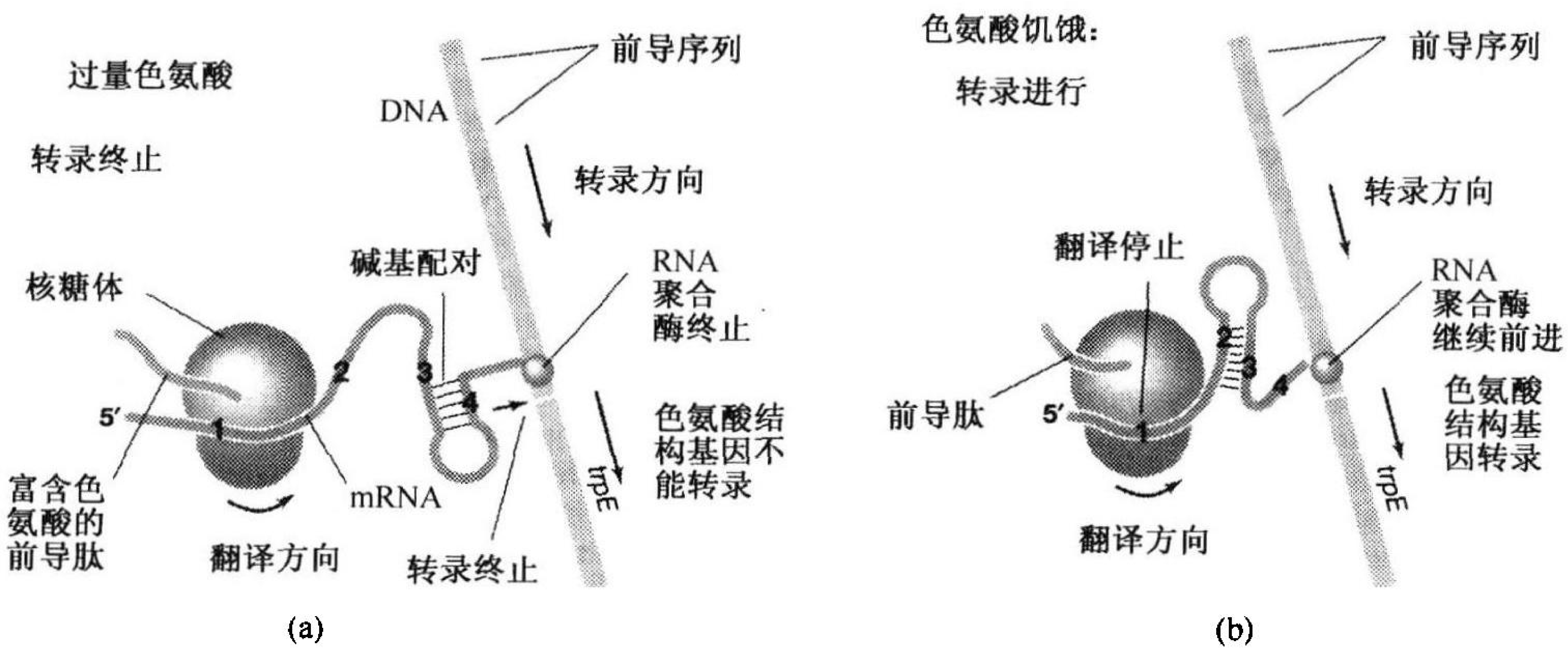


图 8.25 衰减作用机制。在大肠杆菌中，色氨酸操纵子结构基因的转录受弱化作用的调控。前导肽由 mRNA 上的 1 区和 2 区编码。转录出的 mRNA 链，在 2 与 3、3 与 4 两个区域形成双链环。(a) 当色氨酸过量时，核糖体翻译出完整的前导肽，2 区不能和 3 区配对。3 区与 4 区配对形成的环状结构阻止 RNA 聚合酶的前行。(b) 当色氨酸饥饿时，前导肽翻译停止，2 区与 3 区配对成环，3 区与 4 区就不能配对成环，转录可通过前导序列，继续进行。

制了终止子（图 8.25 中的 3 和 4 位点）的形成。这使得 RNA 聚合酶越过终止位点，起始色氨酸结构基因转录。在弱化调控中转录和翻译相互作用，翻译速率影响着转录效率。

衰减作用也存在于大肠杆菌的组氨酸、苏氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸等其他一些氨基酸的生物合成，以及一些重要代谢过程中。如图 8.24b 所示，每个氨基酸生物合成操纵子中的前导肽都是富含这种氨基酸的。组氨酸操纵子就是明显的一例，其前导序列在末端附近含有 7 个连续排列的组氨酸（图 8.24b）。这一长的调节编码区使得衰减作用成为组氨酸主要的调控方式，这可能是一种补偿作用。因为与色氨酸操纵子不同，大肠杆菌中组氨酸操纵子没有负控制方式。

非翻译依赖的衰减作用机制

革兰氏阳性菌，如芽孢杆菌属（*Bacillus*），也利用衰减作用来调节某些氨基酸生物合成的操纵子。然而在革兰氏阴性菌中涉及的是转录和改变 mRNA 二级结构的衰减作用机制，即一种构型导致转录终止。但是，在革兰氏阳性菌中，这个机制与翻译依赖无关，而与 RNA 结合蛋白相关。

在枯草芽孢杆菌中，色氨酸操纵子结合蛋白被称为色氨酸衰减作用蛋白（trp attenuation protein）。当细胞中存在足够量的色氨酸时，这个调节蛋白结合到 mRNA 的前导序列上，终止转录。当色氨酸缺乏时，该蛋白质不能与前导序列结合，mRNA 形成适当的二级结构，使转录继续进行。

衰减作用也可发生在不相关的氨基酸合成基因上。很明显这种机制与氨基酸的量是无关的。大肠杆菌中一些有关嘧啶合成的操纵子（*pyr* 操纵子）受衰减作用调控，在芽孢杆菌中也是这样的。虽然这两种生物都能检测细胞中嘧啶含量，但衰减作用机制完全不同。在大肠杆菌中，衰减作用机制是通过监测转录效率，而不是翻译速率来进行调控的。如果嘧啶含量充足，RNA 聚合酶可以正常速度转录前导 DNA，并在 mRNA 中形成终止型的茎环结构。反之，当嘧啶缺乏时，聚合酶停止在富含嘧啶的序列，导致 mRNA 形成非终止型的茎环结构，使转录继续进行。

在芽孢杆菌中，衰减作用机制是完全不同的。在 *pyr* 衰减作用中，*pyr* mRNA 茎环结构的改变是由 RNA 结合蛋白控制的。在细胞中，当嘧啶过量时，转录终止。在这种情况下，细胞保持一定量的嘧啶合成，嘧啶是细胞合成的重要原料，要和生物合成的需要保持平衡（见 5.16 节）。

概念检查

衰减作用是对 RNA 合成起始后基因表达（转录水平）的调控。衰减作用机制与转录和翻译都有关，因此仅能发生在原核细胞中。

◆ 为什么衰减作用不能发生在真核细胞中?

◆ 解释为什么在 RNA 中，一种茎环结构的形成会抑制另一种茎环结构的形成。

◆ 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中色氨酸操纵子衰减作用有什么区别?

8.12 信号转导和双组分调控系统

细菌通过调控自身的细胞代谢以适应各种环境变化，如温度、pH、溶氧量、营养成分，以及现存细胞数量的改变。因此，细菌必须具备从环境中接收信号，并将信号转导到特异性靶点的调控机制。

在前面章节中，我们了解到一些信号是小分子，可以进入细胞（通常为特异性吸收机制），作为效应子。但是在许多情况下，胞外信号并不能直接传递到调节蛋白，而是首先被感受器接收，然后由感受器将信号传递至其余的调控装置上，这一过程称为信号转导（signal transduction）。

感受器激酶和应答调节子

大多数信号转导系统包括两部分，因此又被称为双组分调控系统（two-component regulatory system）。这一系统的特点是包含两种不同的蛋白质：①位于细胞膜上的特异性感受器激酶蛋白（sensor kinase protein）；②相对应的应答调节蛋白（response regulator protein）。

感受器激酶是一种起着磷酸化作用的酶，磷酸化作用中的磷酸来自 ATP。在细胞质膜表面，感受器激酶可感受到来自环境的信号，并在特异性组氨酸残基上发生自身磷酸化（自动磷酸化；图 8.26）。因此感受器激酶又被称为组氨酸激酶（histidine kinase）。然后磷酸化基团被转移到细胞中的另一个蛋白质上，这个蛋白质称为应答调节子（response regulator）。应答调节子为典型的调节转录的 DNA 结合蛋白，根据调控类型，可以是正控制或负控制模式（图 8.26）。

为了维持平衡，双组分调控系统必须是一个反馈环（feedback loop），这样才能终止起始信号，完成调控循环，为下一个循环做好准备。在这个反馈环中有一个磷酸酶，该酶可以恒定的速率除去应答调节蛋白上的磷酸化基团。在一些情况下，感受器激酶自身也可行使这个功能。但在另一些系统中，需要专一的蛋白质来行使此功能（图 8.26）。磷酸酶的去磷酸化反应通常比应答调节子的磷酸化要慢。但是，如果由于感受器激酶活性降

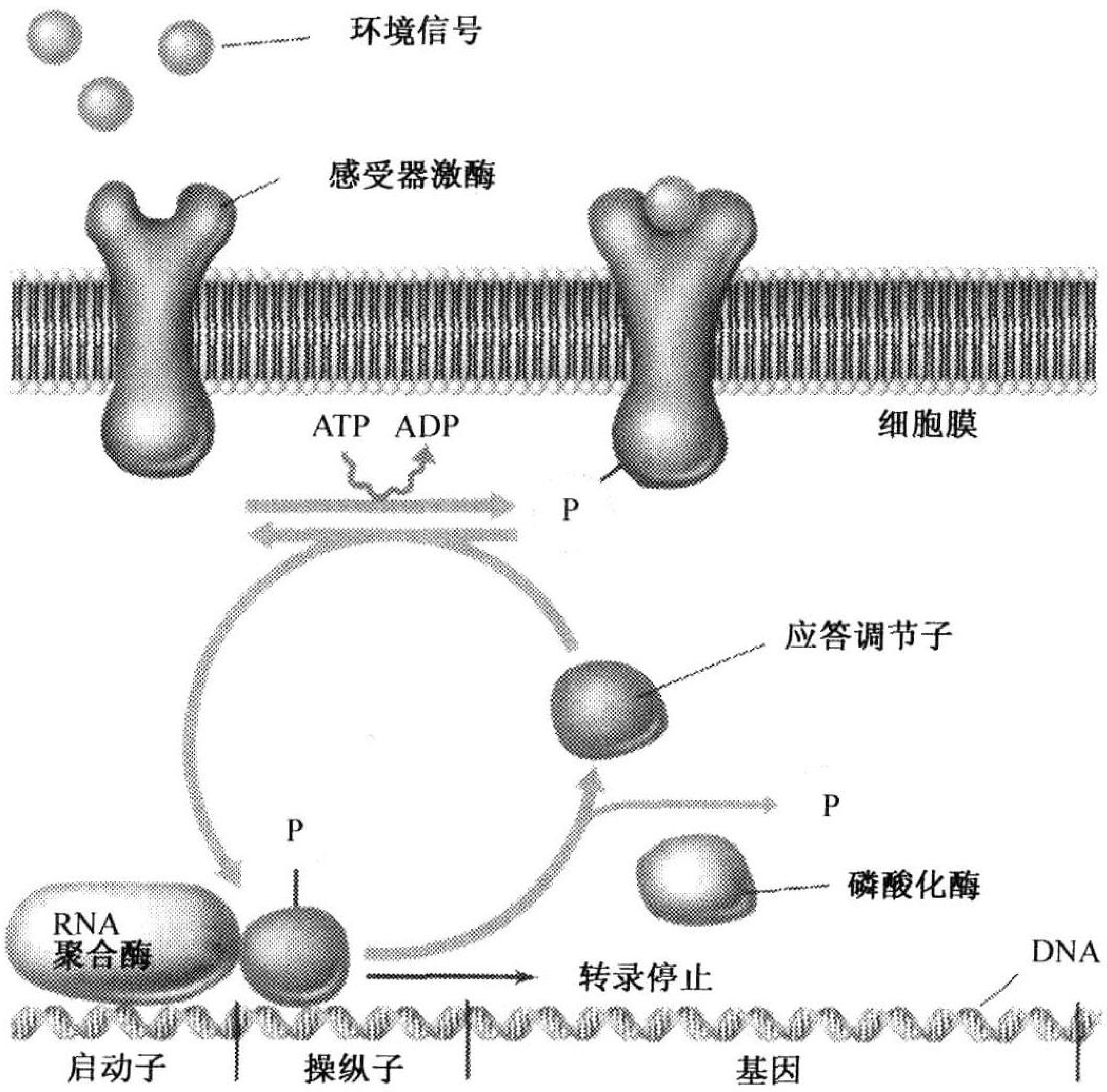


图 8.26 双组分调控系统控制的基因表达。该系统的主要组分包括细胞膜上的感受器激酶，对环境信号的反应为自身磷酸化。然后磷酸化基团转移到另一个主要组分应答调节子上。在该图中，磷酸化应答调节子是一个阻遏蛋白。磷酸酶缓慢从应答调节子上除去磷酸，而完成这一循环。

低，而使得磷酸化停止，那么磷酸酶最终会将应答调节子转变成完全去磷酸化的状态。

双组分调控系统的实例

在很多不同的细菌中，双组分系统均可以调节许多基因。但在古生菌中，双组分系统并不常见，在寄生菌中不存在双组分系统。大肠杆菌的磷酸同化作用、克雷伯氏菌（*Klebsiella*）和根瘤菌（*Rhizobium*）的固氮作用，以及芽孢杆菌（*Bacillus*）中芽孢的形成都是双组分调控系统的典型实例。在大肠杆菌中，估计有近 50 个不同的双组分系统在调控中起作用，其中一些在表 8.3 中列出。

表 8.3 大肠杆菌中，双组分调节系统调节转录的实例

系统	环境信号	感受器激酶	应答调节子	应答调节子的活性[a]
Arc 系统	O_2	ArcB	ArcA	抑制/激活
硝酸盐和亚硝酸盐厌氧调控(*Nar*)	硝酸盐和亚硝酸盐	NarX 和 NarQ	NarL	激活/抑制
			NarP	激活/抑制
氮利用(*Ntr*)	NH_4^+	NR_{II} 和 *glnL* 的产物	NR_I 和 *glnG* 的产物	需要 σ^{54} 在启动子处激活 RNA 聚合酶
Pho 调节子	无机磷酸盐	PhoR	PhoB	激活
膜孔蛋白调控	渗透压	EnvZ	OmpR	激活/抑制

a. 一些应答调节蛋白在不同的基因调控类型中既可以是激活子也可以是阻遏物。虽然 ArcA 可以作为激活子也可作为阻遏物，但在大多数操纵子调控中它都是阻遏物。

许多双组分调控系统也有全局调控现象（表 8.1）。例如，控制渗透压平衡的两个蛋白 OmpC 和 OmpF，是作为大肠杆菌外膜部分被合成的。它们是多孔蛋白，代谢物可以通过它们穿过革兰氏阴性菌的外膜（见 4.9 节和图 4.29）。如果渗透压很低，细胞合成大孔的 OmpF 蛋白；当渗透压很高时，细胞就合成小孔的 OmpC 蛋白。这个系统的应答调节子是 OmpR。当 OmpR 被磷酸化后，激活 *ompC* 基因，抑制 *ompF* 基因转录。大肠杆菌中 *ompF* 基因也受反义 RNA 调控（见 8.14 节）。

在一些情况下，双组分系统中含有复杂的调控元件。例如，在 *Ntr* 调控系统（*Ntr* regulatory system）中，包括大肠杆菌在内的许多细菌都能调节氮的同化作用，应答调节子是 NR_I 激活蛋白（氮调节子Ⅰ）。NR_I 是通过 σ^{54}（即更替 σ 因子）的 RNA 聚合酶识别启动子而激活转录（见 8.9 节和表 8.2）。在 Ntr 系统中，感受器激酶 NR_{II}（氮调节子Ⅱ）具有双重作用，既可作激酶，又可作磷酸酶。NR_{II} 的活性则由另一个蛋白质 P_{II} 的磷酸化状态所调控。

Nar 调控系统（*Nar* regulatory system；表 8.3）控制一系列厌氧条件诱导的基因，它有 2 个不同的感受器蛋白和 2 个不同的应答调节子。另外，这一系统调控的所有基因又都受到只在厌氧条件下具有活性的转录调节蛋白 FNR 的全局调控（表 8.1）。可见原核基因表达调控可以瞬间变得很复杂。

由于组氨酸激酶分子中有明显的氨基酸保守序列，因此我们可以通过基因组分析的手段监测双组分调节系统的基因。双组分系统不仅存在于许多细菌中，在其他真核微生物如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中也存在。高等真核生物也利用磷酸化作为信号转导机制对环境信号做出反应。一些种类的古生菌包括极端嗜盐菌［盐杆菌属（*Halobacterium*）的种，见 3.3 节］和产甲烷菌（见 13.4 节）也是利用双组分系统调节特异基因表达，包括有编码趋化蛋白的基因（见 8.13 节）。

概念检查

信号转导系统将环境信号传递到细胞内。典型的原核细胞信号转导包括整合在膜上的感受器激酶和胞质的应答调节子。应答调节子的活性依赖它的磷酸化水平。

◆ 什么是激酶，它们在双组分调控系统中的作用是什么？
◆ 当环境信号消失后，双组分系统如何对二次刺激产生反应？

8.13 趋化性调控

不是所有的双组分系统都是调节转录的。我们前面已经讨论过这样的情况，原核生物既可向着吸引物运动又可远离排斥物，这个过程称为趋化性（chemotaxis；见 4.12 节）。由于原核生物太小，它们感受不到化学物质的空间梯度，但是它们可以对时间梯度做出反应。也就是说，随着时间的推移，它们能感受到环境中化学物质浓度的变化，而不是化学刺激物的绝对浓度。原核生物利用双组分系统来感知吸引物或排斥物的暂时变化，并利用这些信息调控鞭毛旋转。

第一步：对信号反应

趋化性的机制是复杂的，涉及多种不同的蛋白质。一些感受器蛋白（sensor protein）位于细胞膜上，它们可以感知吸引物和排斥物的存在。这些感受器蛋白本身不是感受器激酶，但是它们可以和细胞质中的感受器激酶相互作用，使细胞在一段时间后感知物质浓度的变化。

这种感受器蛋白被称为甲基趋化性蛋白（methyl-accepting chemotaxis protein；MCP）。在大肠杆菌中，已鉴定到5种不同的MCP，它们都是跨膜蛋白（图8.27）。每个MCP都可以感知不同的化合物。例如，大肠杆菌的*Tar*转导子，能够感知吸引物天门冬氨酸和麦芽糖，也能感知排斥物重金属钴和镍。

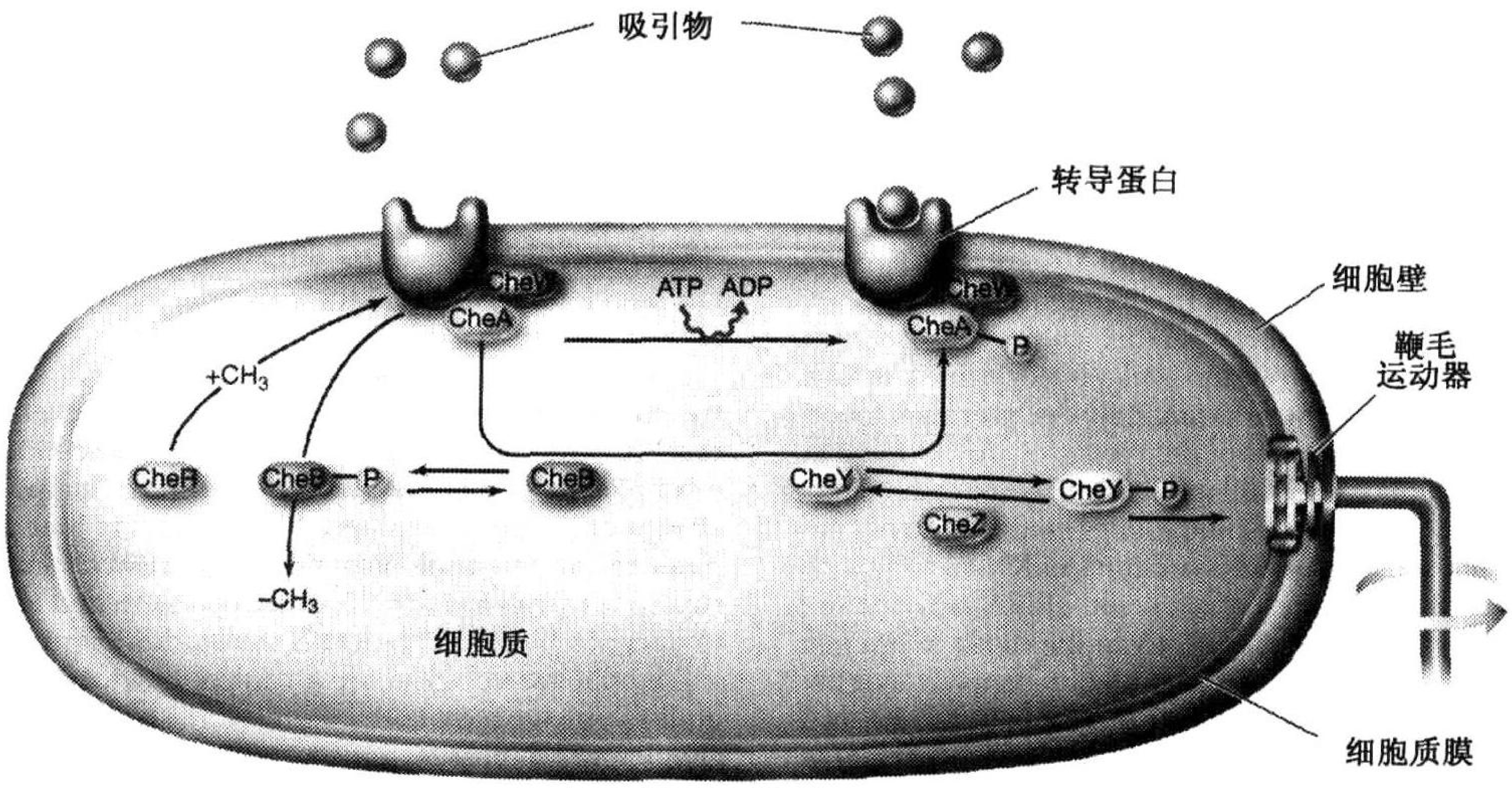


图8.27 在细菌趋化性中，MCP、趋化性（Che）蛋白和鞭毛运动器的相互作用。MCP与感受器激酶CheA和相应的CheW蛋白一起形成一个复合体。这种结合引起CheA到CheA-P的信号调节自身磷酸化作用。然后CheA-P将应答调节子CheB和CheY磷酸化。磷酸化的CheY（CheY-P）直接与鞭毛运动器开关相互作用。CheZ可将CheY-P去磷酸化。CheR可持续将甲基添加到转导子上。CheB-P（不是CheB）能去甲基化。MCP的甲基化程度控制着它们对吸引物和排斥物的反应，最终达到一个适应状态。图4.56显示了鞭毛运动器的结构。

MCP可与吸引物和排斥物直接结合。但在某些情况下，也可通过与周质结合蛋白相互作用而间接结合。MCP与吸引物或排斥物的结合起始了一系列与胞质蛋白的相互作用，从而影响鞭毛的旋转。如果鞭毛逆时针旋转，那么细胞持续前进；若鞭毛顺时针旋转，则细胞将翻筋斗，重新定位并开始向随机方向移动（见4.14节）。

MCP可以与胞质蛋白CheW和CheA（图8.27）相互作用。CheA是趋化作用中的感受器激酶。当一个MCP蛋白与一种化学物质结合后，发生构象改变，引起CheA自身磷酸化（在CheW的帮助下），形成CheA-P。吸引物可降低磷酸化速率，而排斥物则增加磷酸化速率。然后CheA-P使CheY磷酸化（形成CheY-P），这是效应调节子。CheA-P还可以使CheB磷酸化，这是另一个效应调节子。但是这个反应比CheY磷酸化的反应慢得多。我们将在后面讨论CheB-P的活性。

第二步：控制鞭毛旋转

CheY 是双组分系统中的关键蛋白质，因为它控制着鞭毛的旋转方向。CheY-P 与鞭毛运动器相互作用，使鞭毛顺时针旋转，引起细胞翻筋斗（运动器由 *fla* 基因编码的蛋白质组成，见 4.14 节）。非磷酸化的 CheY 不能与鞭毛运动器结合，鞭毛运动器保持逆时针旋转，细胞继续前进。另一个蛋白质 CheZ 可以使 CheY 去磷酸化，从而使细胞持续前进而不是翻筋斗。排斥物可提高 CheY-P 的水平，导致细胞翻筋斗；吸引物可降低 CheY-P 水平，导致细胞向前游动。

第三步：适应

除了收集环境信号和调节鞭毛旋转外，上述系统必须能够检测到周围化学物质的浓度随时间的变化。这一问题被趋化性的另一过程解决，这个过程称为适应（adaptation）。适应是一个反馈环，是完成上述反馈循环所必需的，它涉及前面提到的由 CheB 共价修饰的 MCP。

正如它们的名称所暗示的，MCP 可被甲基化。细胞质蛋白 CheR（图 8.27）能够利用 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基供体，连续地、低速地将甲基加到 MCP 上。应答调节子 CheB 的磷酸化形式是一种去甲基化酶，可将 MCP 上的甲基除去。MCP 的甲基化水平影响着它们的构象，从而控制着对感受信号的适应。下例为这一过程。

如果吸引物持续高水平存在，那么 CheA（CheY 和 CheB）的磷酸化就保持在较低水平，细胞平滑向前游动。在这一过程中，MCP 的甲基化水平增高（因为去甲基化作用的 CheB-P 不存在）。但是，当 MCP 完全被甲基化后，就不再对吸引物做出反应了。因此，即使吸引物的浓度仍保持在较高水平，CheA-P（和 CheB-P）的水平也会增高，细胞开始翻筋斗。但是，此时 MCP 就可以被 CheB-P 去甲基化。去甲基化一旦发生，感受器被重新调整，又能对吸引物做出反应了。

这一情况与细胞对排斥物的反应刚好相反。完全甲基化的 MCP 可以有效地感知排斥物浓度的增加，并发出信号使细胞开始翻筋斗。当 MCP 慢慢去甲基化后，细胞开始朝随机方向运动。就适应机制来说，趋化作用能成功地使细胞随着时间的推移感知吸引物和排斥物浓度的变化。

概念检查

趋化性涉及信号转导的复杂调控体系，它是通过改变有关蛋白质的活性调节的，而非通过合成来实现调控的。甲基化作用可使该体系重排，以接受新的信号，这一过程称为适应。

- 在趋化性中什么是基础应答调节子，什么是基础感受器激酶？
- 为什么适应是重要的？

8.14 RNA 调控与核糖开关

本章主题之一是蛋白质合成的转录调控。少数情况下，基因表达也受翻译水平调控，在这两种调控方式中调节因子都是蛋白质。但是在一些调控形式中，调节因子是 RNA，不是蛋白质，这在控制基因表达中起着重要作用。

RNA 调控广泛存在于原核和真核生物中。如在大肠杆菌中，已发现一些小 RNA（small RNA，sRNA）可以与其他 RNA 或者小分子结合，从而对细胞生理的各方面进行调控。sRNA 长度为 40～400 个核苷酸，不能编码蛋白质、核糖体 RNA 或者转运 RNA。

目前已知的 sRNA 作用机制至少有 3 种。前面已经介绍了在信号识别颗粒（signal recognition particle）中存在一种 sRNA，这种识别颗粒是核糖核蛋白，负责识别那些新合成的需要分泌到胞外的蛋白质（见 7.17 节和图 7.41）。sRNA 的第二个作用机制是通过碱基互补的方式与 mRNA 结合，这就束缚了 mRNA，阻止了它的翻译（图 8.28a）。由于这种 sRNA 的序列与 mRNA 的正义链互补，因此具备这种活性的小 RNA 称为反义 RNA（antisense RNA）。在不适宜其调控基因表达的条件下，反义 RNA 的转录加强，反义 RNA 是由与编码 mRNA 基因相互补的基因编码的。反义 sRNA 存在于细胞质中，可与它们互补的 mRNA 结合，形成双链 RNA。双链 RNA 不稳定，很快会被特异性核酸酶降解（图 8.28a）。

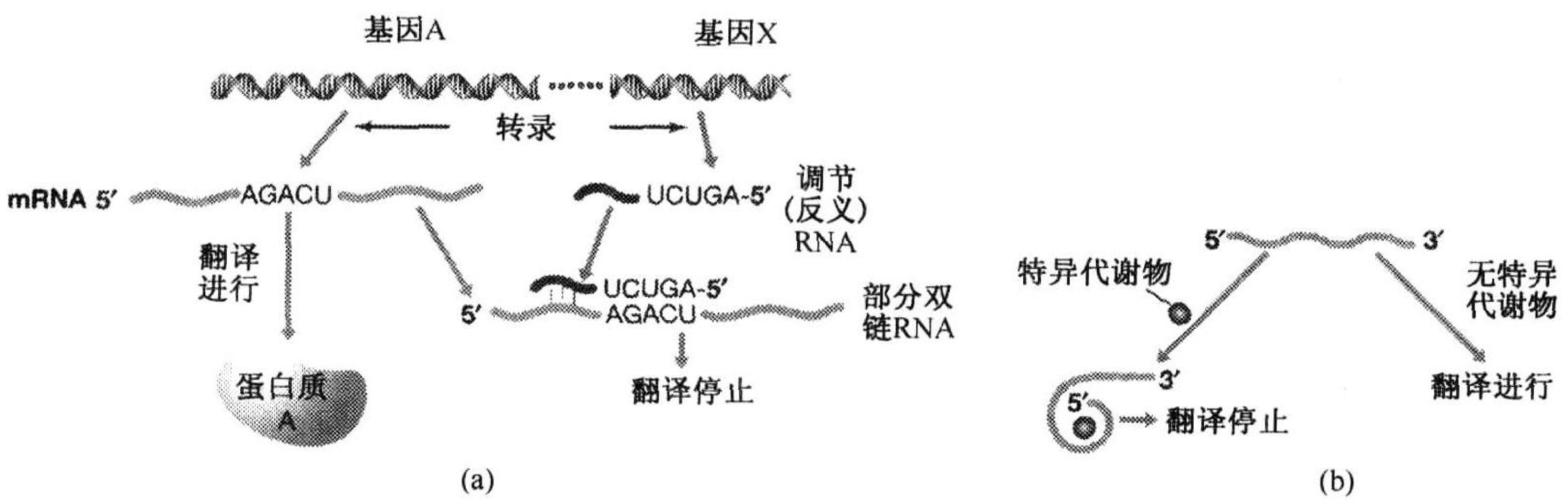


图 8.28 调节 RNA。（a）反义 RNA。基因 A 从它的启动子（见 7.10 节）开始转录产生 mRNA，经过翻译可以形成蛋白 A。基因 X 是一个小基因，它的序列与基因 A 部分相同，但是它的启动子在相反的一端。因此，如果它转录就产生与基因 A 的 mRNA 完全互补的 RNA。当这两种 RNA 配对时，翻译就被抑制。（b）核糖开关。与特异性代谢物结合，影响核糖开关的部分 mRNA二级结构，从而抑制了翻译。

核糖开关

另一种特殊的小 RNA 是核糖开关（riboswitch）。这种小 RNA 是 mRNA，它不仅包含编码序列，还包含可与小分子结合的上游序列（图 8.28b）。核糖开关存在于多种生物合成途径中，包括辅酶因子如维生素 B_1、核黄素和维生素 B_{12}的合成，以及一些氨基酸、腺嘌呤、鸟嘌呤的合成。

与特定核糖开关结合的分子是蛋白质合成的产物，这一蛋白质是由核糖开关中部分

mRNA 编码的。硫胺核糖开关的 mRNA 区域编码参与硫胺生物合成的酶，硫胺可与该核糖开关编码序列的上游结合，使其形成茎环结构，从而抑制翻译（图 8.28b）。

我们可以发现，核糖开关与我们以前看到过的一种调控机制类似。在本章开始我们讨论了受反馈抑制的调控酶（见 8.1 节）。当别构蛋白与特定代谢物结合后，它们的构象发生变化，从而破坏了整个代谢途径中的酶活（图 8.5）。核糖开关能够作为两类调控形式的任何一种。在代谢物不存时，核糖开关上的 SD（Shine-Dalgarno）核糖体结合位点，可与核糖体结合，起始翻译。当细胞内有一个代谢物足够量的信号时，代谢物就会与核糖开关结合，此时核糖开关的二级结构就会阻止 mRNA 与核糖体的结合，从而抑制翻译。

核糖开关为何普遍存在，并进化的呢？到目前为止人们仅在一些细菌、植物和真菌中发现了核糖开关。一些科学家认为，在世界上核糖开关是出现在细胞、DNA 和蛋白质之前的 RNA 残存物，因为人们推测在那时有催化活性的 RNA 是唯一可以自身复制的生命形式（见 11.2 节）。在这样一个环境中，核糖开关可能是一个原始的代谢调控机制。简单地说，就是 RNA 生命体可以通过核糖开关控制其他 RNA 的合成。当蛋白质进化形成后，其最初的合成调控机制可能也是核糖开关。如果这些假设是正确的话，那么保留到现在的核糖开关，就是这种简单调控形式的最后痕迹。因为正如本章前面所讲述的，大部分调控机制都已被调节蛋白质所代替。

复习题

1. 如果反馈抑制能有效的抑制酶活，那么细胞为什么还有调控酶合成的机制呢？（见 8.1 节）
2. 将大肠杆菌的 DAHP 合成酶的调节方式与具有协同反馈抑制的有机体调节方式进行比较。哪个需要更多的蛋白质？什么情况下两种调控结果一致？（见 8.2 节）
3. 分别在何种情况下麻风杆菌中的 GyrA 蛋白的合成与真核细胞剪接机制相似或者不相似？（见 8.3 节）
4. 为什么与双链 DNA 专一性结合的蛋白质，不能与单链 DNA 上同样的序列结合呢？（见 8.4 节）
5. 为什么大多数生物合成操纵子仅需要负控制就能很有效的调控，而大多数分解代谢操纵子则需要正控制和负控制调控？（见 8.5 节和 8.6 节）
6. 以乳糖操纵子为例，描述分解代谢激活蛋白（CAP），分解代谢物阻遏调节蛋白的作用机制。对于这个操纵子来说，CAP 蛋白不是阻遏物。描述 CAP 蛋白是阻遏物的基因调控区。（见 8.7 节）
7. 什么因素引发了应急反应？为什么在应急反应中发生的事件是反应引发的逻辑结果？（见 8.8 节）
8. 描述大肠杆菌在热激条件下形成的蛋白质。它们对细胞具有什么作用？（见 8.9 节）
9. 为什么群体感应被认为是一种节约细胞能源的调控机制？（见 8.9 节）
10. 转录衰减作用是怎样进行的？“衰减作用”的实际意义是什么？为什么在大肠杆菌中有几种调控不同氨基酸合成途径的衰减作用类型，而在真核生物中没有发现？

(见 8.11 节)

11. 原核细胞中，命名信号转导调控的双组分指的是什么？每种组分的作用是什么？(见 8.12 节)
12. 适应调控可以调整鞭毛的旋转，这个调控是怎样进行的？(见 8.13 节)
13. 反义 RNA 调控与核糖开关调控的区别是什么？哪种调控形式更适合生物合成途径中酶合成的调节？为什么？(见 8.14 节)
14. 尽管属于完全不同的调控的机制，8.2 节和 8.14 节中讨论的机制具有相似性，请解释。

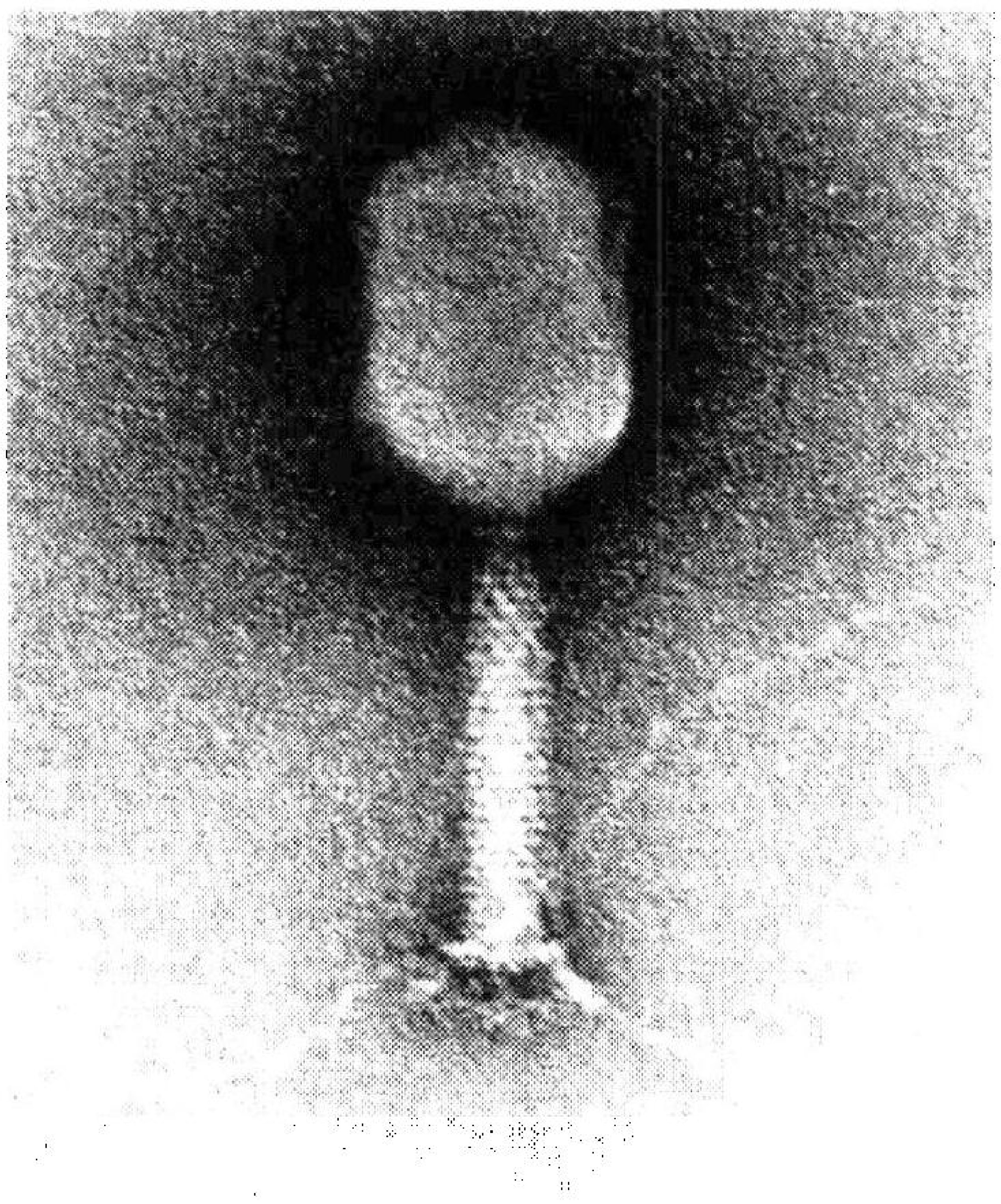
应用题

1. 如果调节蛋白结合区被删除，那么负控制下的启动子调节会是怎样的？正控制下的启动子调节又会怎样？
2. 在正控制下，大肠杆菌的启动子与它 DNA 的同义序列并不紧密匹配（见 7.9 节），为什么？
3. 在大肠杆菌嘧啶生物合成途径中，一些基因受衰减作用的调控，实际上既涉及转录，也涉及翻译。你能解释细胞靠什么机制测定嘧啶核苷酸的水平，从而确保翻译的进行。
4. 这章中讨论的大部分调控都涉及调节蛋白。但是也存在 RNA 调节。描述这两种不同类型的 RNA 调节的任何一种是如何完成乳糖操纵子的负控制。
5. 许多氨基酸生物合成操纵子受衰减作用调控的同时也受负控制调控。考虑到细菌生存环境是变化的，衰减作用调控作为辅助调控对细菌的生存有何意义？

(刘 方 译，李明春 校)

9

病毒学基础



病毒是感染性因子，其复制需要细胞。虽然许多病毒的基因组是双链脱氧核糖核酸（DNA），但也有一些是单链DNA，还有一些是RNA。病毒的感染形式称为病毒粒子，如图所示的噬菌体T4。

词汇表

噬菌体（bacteriophage）：一种感染原核细胞的病毒

早期蛋白（early protein）：病毒感染后即刻合成的蛋白质

晚期蛋白（late protein）：在病毒感染末期合成的蛋白质

溶原菌（lysogen）：含有原噬菌体的细菌

溶原化途径（lysogenic pathway）：病毒感染后的一系列步骤，导致形成溶原状态，在该状态下病毒基因组以原噬菌体的形式随宿主复制

裂解途径（lytic pathway）：病毒感染宿主后，完成自身复制以及裂解细胞的一系列步骤

负链病毒［minus（negative）-strand virus］：一种携带 RNA 基因组的病毒，病毒颗粒中 RNA 链与病毒 mRNA 反义（或互补）

核衣壳（nucleocapsid）：病毒核酸及蛋白质复合物

癌基因（oncogene）：其表达引起肿瘤形成的一种基因

噬菌斑（plaque）：由于病毒感染引起的敏感细胞层上出现的裂解圈或细胞生长抑制圈

正链病毒［plus（positive）-strand virus］：一种携带 DNA 或 RNA 基因组的病毒，该病毒基因组与病毒的 mRNA 序列一致

朊病毒（prion）：一种胞外形式不含有核酸的具有感染性的蛋白质

原病毒/原噬菌体（provirus/prophage）：温和性病毒的基因组，复制时通常会整合到宿主染色体中

反转录病毒（retrovirus）：一种 RNA 病毒，以 DNA 中间体作为其复制循环中的一个部分

反转录（reverse transcription）：在反转录酶的作用下从 RNA 到 DNA 复制信息的过程

温和性病毒（temperate virus）：病毒的基因组可以与宿主基因组同时复制，并且可以形成一种溶原化状态而不导致细胞死亡

转化（transformation）：真核细胞由正常细胞转变为癌细胞的过程

病毒粒子（virion）：完整的病毒颗粒，核酸被蛋白质外壳或其他物质包裹

烈性病毒（virulent virus）：感染后杀死细胞的病毒，非温和性病毒

病毒（virus）：一种含有 RNA 或 DNA 的遗传因子，能在细胞中复制，但是具有特征性的细胞外形式

类病毒（viroid）：能导致多种植物病害的小环状单链 RNA

病毒是一种能够独立于细胞染色体而依赖于细胞进行复制的遗传因子（见 7.4 节）。但是，不同于质粒这类的遗传因子（见 7.4 节和 10.9 节），病毒具有一种细胞外形式能延长它在宿主外存活时间，同时也更利于从一个宿主传递到另一个宿主。为了增殖，病毒必须进入细胞进行复制，这个过程叫做感染。被感染的细胞称为宿主。病毒研究是微生物中的重要分支，称为病毒学，本章将介绍该领域的基础知识。

病毒，像质粒还有其他遗传因子一样，充分利用细胞的代谢机制，反过来也能够给宿主细胞带来重要的新的性质。细胞分裂后产生的新细胞如果都保持了病毒的基因组，那么这些性质就能够遗传。这些变化通常是无害的，甚至可能是有益的。一些病毒能够在复制的同时破坏宿主细胞，这也就解释了某些病毒为什么会引起病变。我们在后面章节中将会介绍一些引起人类疾病的病毒（见第 26 章～29 章）。

本章共分为四部分。第一部分介绍病毒结构的基本概念；第二部分介绍宿主细胞以及病毒是如何被定量的；第三部分介绍病毒增殖的基础分子生物学知识；最后一部分概述了一些能感染细菌及动物的病毒。关于病毒的多样性将会在第 16 章中介绍。曾在第 7 章和第 8 章提到的大分子合成和基因调控方面的内容，本章也有相应补充。

病毒是我们星球上为数众多的微生物之一，并且它们能感染各种类型的细胞生命体。因此，它们本身就值得我们研究。然而，科学家们也希望通过研究病毒获得有关细胞的遗传学、生物化学及疾病发生的知识。从第 10、15 章和引言中还可以看到，病毒还是人们研究微生物遗传学和基因工程的重要工具。

I 病毒和病毒粒子

9.1 病毒的一般性质

病毒能够以细胞外和细胞内两种形式存在。在细胞外，病毒是含有核酸、核酸外被蛋白质围绕的小颗粒，特殊的病毒还含有其他大分子。在胞外时，病毒颗粒或称作病毒粒子（virion）没有自主代谢，也没有呼吸和生物合成功能。当进入细胞时，病毒粒子的作用是从产生病毒粒子的细胞中携带病毒核酸到另外的允许病毒核酸进入的细胞中去。一旦进入新细胞，病毒的细胞内状态就开始了。在细胞内状态中，病毒发生复制，形成新的病毒基因组并合成病毒衣壳的组分。

病毒基因组很小，主要编码那些不能从宿主获得的功能蛋白质。因此，它们在细胞中的复制极度依赖于宿主细胞的结构和代谢组分。病毒反过来指导宿主的代谢功能以利于病毒的复制和新的病毒粒子的组装。最后，新病毒颗粒释放，继续重复这个过程。

病毒基因组

我们知道，所有细胞都含有双链 DNA 基因组（见 7.1 节）。但是，病毒中既包括 DNA 基因组也包括 RNA 基因组。还有一类病毒，在复制循环的不同阶段能分别以 DNA 和 RNA 为遗传物质。病毒可以根据病毒粒子中的核酸是 DNA 还是 RNA 而分类，而后可以再根据是单链还是双链，或根据是线状还是环状进行进一步分类（图 9.1）。

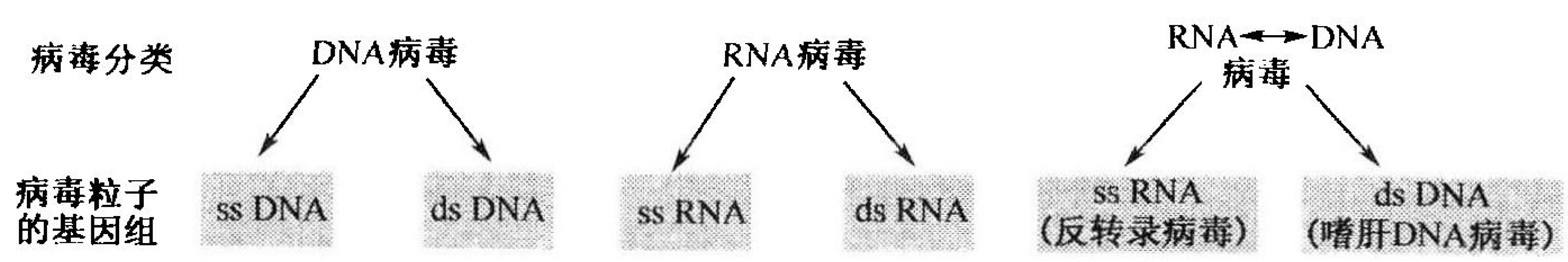


图 9.1　病毒基因组。病毒的基因组可以由 DNA 或是由 RNA 构成，有些病毒在生活循环的不同阶段会以这两种核酸作为遗传物质。不过，任何特定类型的病毒粒子中只发现含有一种核酸类型，可以是单链（ss）、双链（ds）或部分双链，如嗜肝病毒。一些病毒的基因组为环状，但大多数是线性的。

尽管它们的基因组结构是多样的，病毒还是遵循分子生物学中的中心法则（见 7.1 节）：遗传信息都是从核酸传递到蛋白质。另外，所有的病毒都利用细胞的翻译

机制。因此，不论其基因组结构怎样，所形成的信使 RNA（mRNA）都能被宿主核糖体翻译。

病毒宿主和分类学

除了它们的基因组，病毒也可以根据它们感染的宿主不同而分为动物病毒、植物病毒和细菌病毒。细菌病毒，也称为噬菌体（bacteriophage，缩写为 *phage*；希腊文译为 *phagein*，意思是"吃"），是研究病毒复制的分子生物学和遗传学的模式系统。细菌（*Bacteria*）或者古生菌（*Archaea*）都能被专门的噬菌体感染。许多有关病毒的基本概念都来自细菌病毒，然后应用于其他更高等生物的病毒。动物病毒因其在医学上的重要性也被广泛研究，而植物病毒尽管在现代农业中很重要却是所有病毒中研究最少的。

病毒的一般分类系统是像原生动物一样采用目、科甚至属等多种分类单元（见 11.10 节）。以科为分类单位似乎更有用。同一个科的病毒具有相同的病毒粒子形态、基因组结构和复制策略。病毒科都已命名，尾缀为-viridae（如痘病毒科，Poxviridae），我们将在第 16 章讨论一些相关内容。

概念检查

病毒粒子是病毒的胞外形式，含有一个 RNA 或 DNA 基因组。病毒基因组通过感染侵入新的宿主细胞。病毒为了自身的复制可以反过来指导宿主的代谢。病毒可依据复制方法和宿主类型进行分类。

◆ 怎样区别病毒和质粒?

◆ 怎样区别病毒粒子和细胞?

◆ 什么是噬菌体?

9.2 病毒粒子的特性

病毒粒子的大小和形状多种多样。病毒比原核细胞小，大小为 0.02～0.3μm（20～300nm）。通常，用于衡量病毒的单位是纳米（nm），它是微米（μm）的 1/1000。痘病毒，最大的病毒之一，直径约 200nm（大小相当于最小的细菌细胞）。脊髓灰质炎病毒（poliovirus），是最小的病毒之一，直径仅有 28nm（相当于核糖体大小）。

病毒的基因组比绝大多数细胞的基因组要小。多数细菌的基因组 DNA 为 1000～5000kb，已知最小的细菌基因组为 500kb（有趣的是，基因组最小的细菌也像病毒一样，是寄生生物，在其他细胞中复制，见 12.13 节，12.27 节和 13.11 节）。已知最大的病毒基因组是细菌噬菌体 G，大小约 670kb。这类能感染巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）的病毒是目前已知的、基因组比一些细胞基因组还大的、为数不多的病毒之一。表 9.1 列出了一些有代表类型的病毒基因组大小。一些病毒基因组很小，只有不到 5 个基因。如表中所示，有些病毒的基因组，如呼肠孤病毒（reovirus），不是由单一分子组成，而是分成了几段。

表 9.1 病毒基因组的一些类型

病毒	病毒基因组				
	宿主	病毒粒中核酸类型	结构	分子数	基因组大小[a]
H-1 细小病毒	动物	单链 DNA	线状	1	5176 碱基
ΦX174	细菌	单链 DNA	环状	1	5386 碱基
猴病毒 40(SV40)	动物	双链 DNA	环状	1	5243bp
脊髓灰质炎病毒	动物	单链 RNA	线状	1	7433 碱基
花椰菜花叶病毒	植物	双链 DNA	环状	1	8025bp
豇豆花叶病毒	植物	单链 RNA	线状	不同 2 条	9370 碱基(总)
呼肠孤病毒 3 型	动物	双链 RNA	线状	不同 10 条	23 549bp(总)
λ 噬菌体	细菌	双链 DNA	线状	1	48 514bp[b]
单纯疱疹病毒 I 型	动物	双链 DNA	线状	1	152 260bp
T4 噬菌体	细菌	双链 DNA	线状	1	168 903bp
人巨细胞病毒	动物	双链 DNA	线状	1	22 9351bp

a. 表中所列病毒基因组的大小准确已知，因为它们已被测序。不过，这种准确性会引起误解，因为只有某一种特定品系或分离株病毒被测序。因此，其他分离株的序列和确切碱基数可能会略有不同。本表并没有选择已知的最大和最小的病毒，只是列出有代表性的病毒基因组的大小和结构作为例子，这些基因组具有单链和双链 RNA 和 DNA。

b. 表中所列核苷酸总数包括线性 DNA 的两个末端的 12 个核苷酸的延伸(见 9.11 节)。

病毒结构

病毒粒子的结构极其多样，其大小、形状和化学组分各不相同。核酸通常位于颗粒里面，由蛋白质衣壳（caspid）包裹着。蛋白质衣壳通常由许多单个的蛋白质分子，即结构亚单位构成。这些结构亚单位形成一种精确的高度重复的模式包裹核酸（图 9.2)。

多数病毒基因组都很小，其蛋白质的种类也就很有限。少数病毒衣壳中只有一种蛋白质，但是大多数病毒有几种不同的结构亚单位以特异的方式结合成一种更大的单位，称为衣壳粒（capsomer）（图 9.2 和图 9.3)。决定结构亚单位正常地聚集成衣壳粒的信息就包含在蛋白质本身的结构中，这种装配过程称为自动装配（self-assembly)。

单个病毒粒子可以由许多衣壳粒构成。装配成病毒颗粒的核酸和蛋白质复合物叫做病毒的核衣壳（nucleocapsid)。病毒粒子内部有一种或多种病毒特有的酶。这些酶在感染和复制过程中的作用将在以后讨论。有些病毒是裸露的，而有些病毒在核衣壳外包被有一层膜（图 9.3)。有囊膜病毒在核衣壳外具有一层脂质双分子层膜（见 4.5 节)。与这些膜相连的经常是病毒特异性的蛋白质，它们可能与病毒的吸附和从宿主细胞中释放有关。

病毒的对称性

病毒的核衣壳以高度对称的方式构建。对称性指的是衣壳粒组建为衣壳的方式。当一种对称的结构绕一个轴旋转时，同一种形式会周期性地出现。已发现的病毒中有两种对称结构，对应于杆状和球状两种基本形态。杆状病毒有螺旋对称性，球状病毒为二十面体对称。无论哪种情况，病毒的特征性结构都是由其蛋白质亚单位的结构决定的。

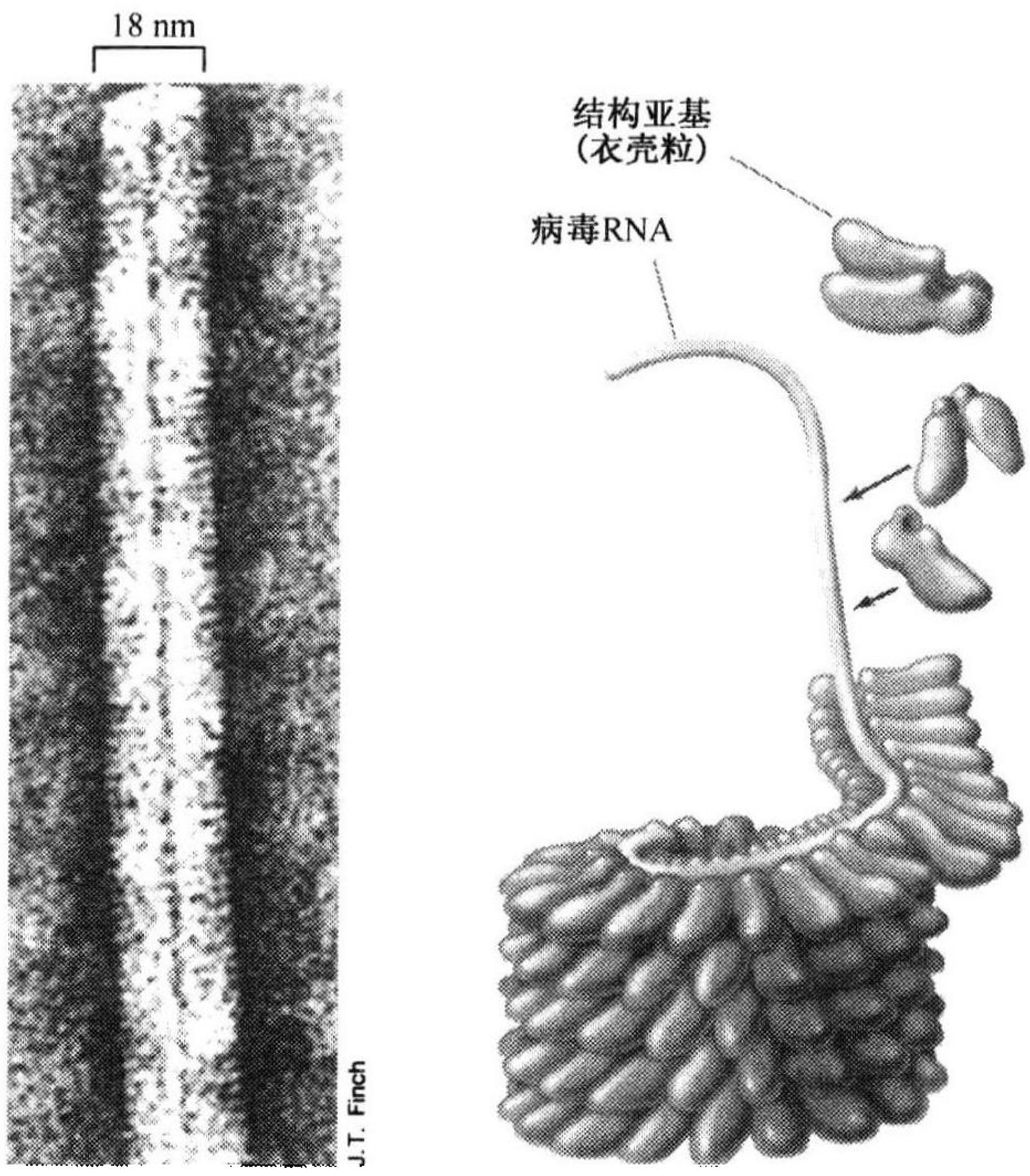


图 9.2 烟草花叶病毒中（tobacco mosaic virus）的核酸和衣壳蛋白的排列。（a）病毒颗粒的高分辨率电子显微照片。（b）烟草花叶病毒粒子的装配。RNA 呈螺旋状构型，被蛋白质衣壳粒所包围，颗粒的中央是空心的。荷兰人马蒂纽斯·拜杰林克（Martinus Beijerinck）是富集培养技术之父（见 1.7 节），也是烟草花叶病毒的发现者。拜杰林克研究了这种疾病，清楚地发现这种感染性因子比细菌还要小。

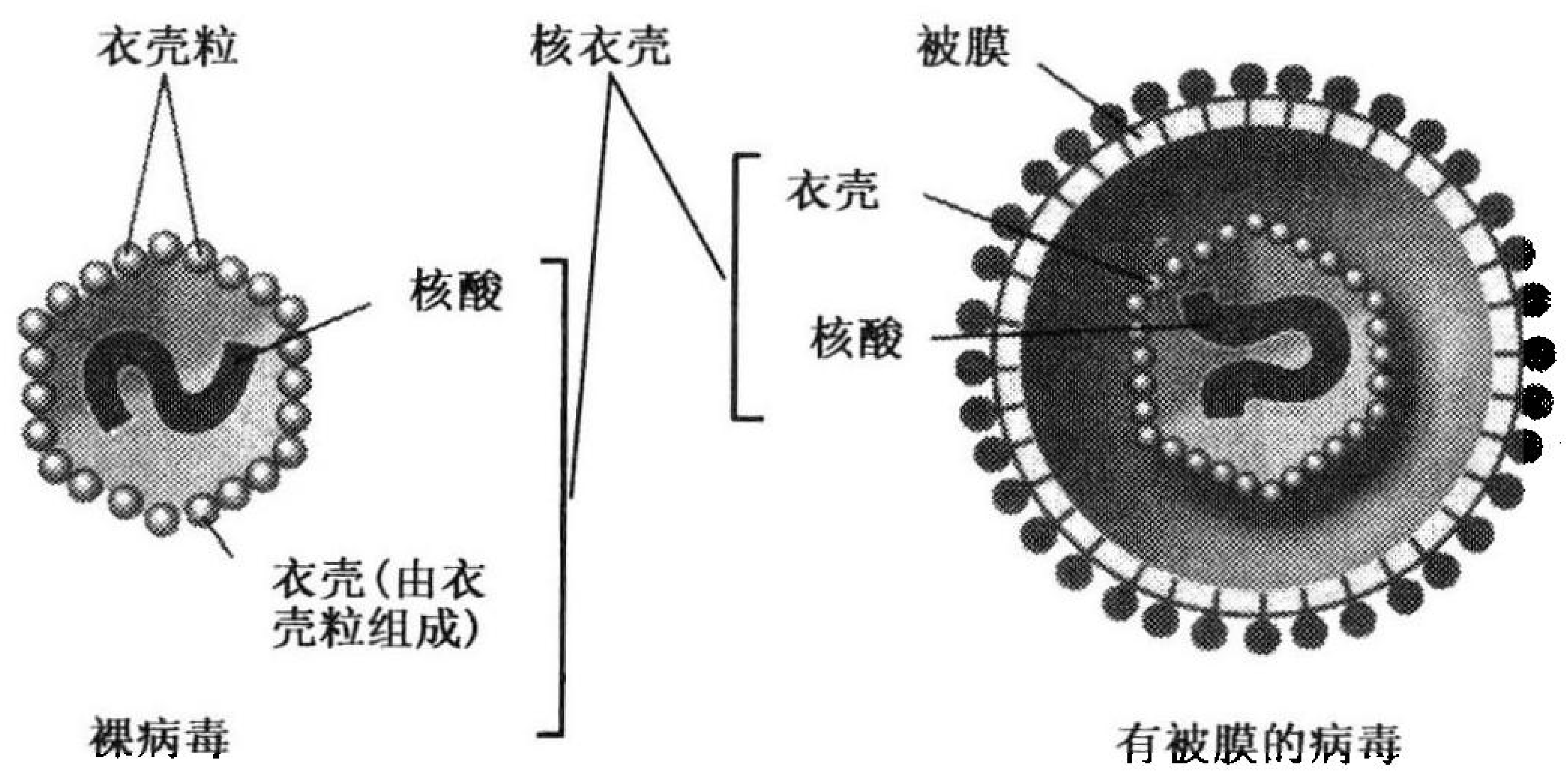
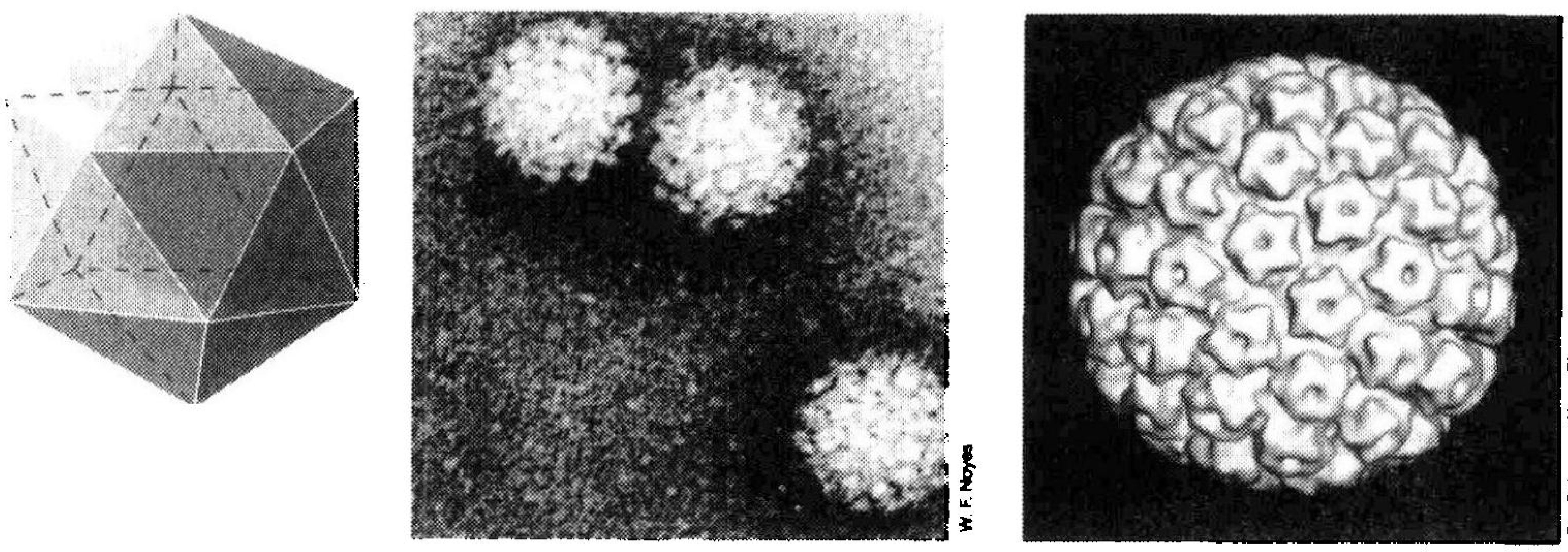


图 9.3 两种病毒颗粒的基本类型：裸露的和有囊膜的病毒比较。许多有囊膜病毒是在从细胞释放出来时被包被上宿主的细胞质膜。

烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus，TMV）具有典型的螺旋对称性（图 9.2）。TMV 是一种 RNA 病毒，由 2130 个相同的衣壳粒排列成螺旋。整个病毒大小为 18nm×300nm。螺旋状病毒的长度由核酸的长度决定，但其宽度则由蛋白质亚单位的大小和包装来决定。

二十面体（icosahedron）是一种有着 20 个面的球形对称结构。二十面体对称结构是封闭壳体中亚单位最为有效的排列方式，因为它使用了最小数目的亚单位。最简单的排列就是每个面有 3 个形态学单位，每个病毒颗粒总共有 60 个单位。但大多数病毒核酸都比 60 个形态学单位组成的壳体所能容纳的核酸分子长。另一种可能允许的封闭包装结构含有 180 个单位，许多病毒的衣壳都是这种构型。其他的已知构型还有 240 个单位的和 420 个单位的。图 9.4a 显示了一个二十面体的模型。图 9.4b 显示了一种典型的二十面体病毒——人类乳头瘤病毒的电子显微图片，它包括 360 个单位。图 9.4c 显示了这种相同病毒的计算机模型。



(a)　(b)　(c)

图 9.4　二十面体对称。(a) 二十面体的模型。(b) 人乳头瘤病毒的电子显微镜相片，呈二十面体对称，单个颗粒直径约为 55nm。(c) 通过对病毒粒子水合物结晶后图像进行计算，推测得到的人乳头瘤病毒三维重建图。

有囊膜的病毒

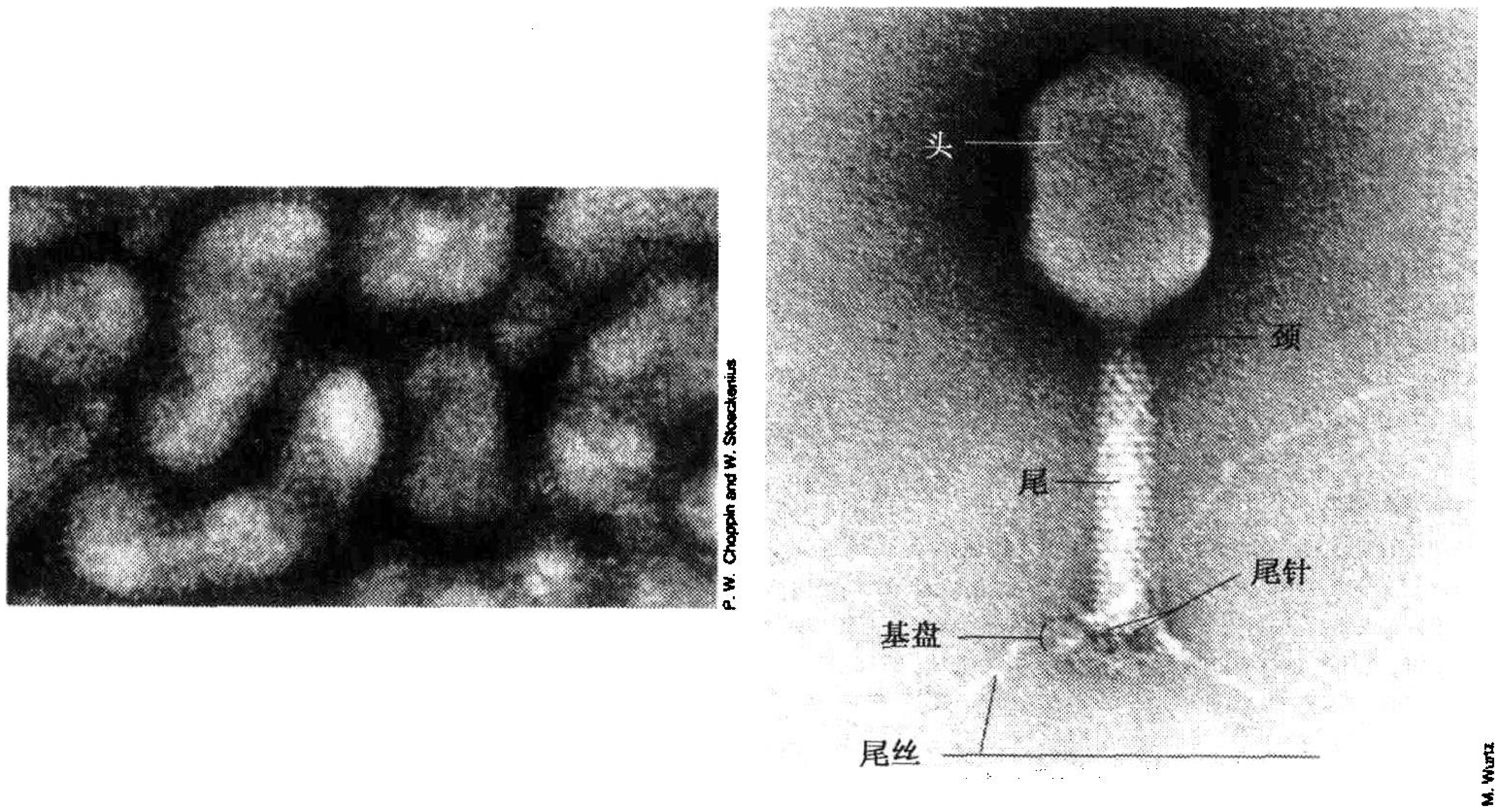
许多病毒的核衣壳外面围绕着复杂的膜状结构（图 9.5a）。大多数有囊膜病毒常感染动物（如流感病毒，influenza virus），也有一些有囊膜的细菌病毒和植物病毒。病毒的囊膜由镶嵌着蛋白质（通常是糖蛋白）的脂双层组成。尽管蛋白质是由病毒编码的，但是脂质则来源于宿主的细胞膜。有囊膜病毒的对称性不仅体现在整个病毒颗粒上，也体现在包裹在囊膜里的核衣壳。

病毒颗粒的囊膜有什么功能呢？我们会在以后讨论，但是请注意囊膜是最先与细胞发生作用的病毒颗粒的结构组分。病毒感染的特异性，以及侵入细胞的某些方面都在一定程度上受到囊膜特性的控制。

复杂病毒

有些病毒颗粒比目前为止任何讨论到的病毒更为复杂，由几个独立的有不同形状和对称性的部分组成。结构最复杂的是一些细菌病毒，不但有一个二十面体的头部，还有螺旋状的尾部。有些细菌病毒如 *E. coli* 噬菌体 T4（图 9.5b），它的尾部本身就是一个相当复杂的结构。完整的 T4 噬菌体尾部具有几乎 20 多种独立的蛋白质，头部则有更多的蛋白质。这些复杂病毒的装配也很复杂。例如，T4 噬菌体的整个尾部先组装成一

种亚结构，然后再加到含有核酸的头上面。最后，由其他蛋白质构成的尾丝再加到上面形成成熟的、具有感染性的病毒颗粒。



(a) (b)

图 9.5 动物病毒和细菌病毒的电子显微镜照片。（a）流感病毒，一种有囊膜的病毒。单个颗粒直径约为 80nm，但是却没有固定的形状（见 16.8 节和图 16.15）。流感病毒具有单链 RNA 基因组。（b）*E. coli* 噬菌体 T4。尾部的组分参与病毒粒子对宿主的吸附和核酸的注入（图 9.10）。头部直径约为 85nm。T4 噬菌体具有双链 DNA 基因组。

病毒粒子中的酶

病毒粒子不能完成代谢过程，因此在宿主细胞外，病毒粒子的代谢是停滞的。不过有些病毒确实含有在感染过程中起作用的酶。这些酶中有一些是感染过程早期所必需的。例如，一些噬菌体包含裂解酶（见 4.8 节），这种酶能使细菌细胞壁上产生一个小洞从而使得病毒核酸得以进入。在感染后期会再次大量产生裂解酶，这是为了裂解宿主细胞，从而释放病毒颗粒。

一些病毒包含它们自己的核酸聚合酶。例如，反转录病毒为 RNA 病毒，它通过 DNA 中间体复制。这些病毒带有 RNA 依赖的 DNA 聚合酶，称作反转录酶，这种酶可以以 RNA 为模板反向转录成 DNA 中间体。其他病毒包括 RNA 基因组并且需要它们自己的 RNA 聚合酶。这些病毒粒子中的酶都是必需的，因为细胞内不含有能以 RNA 为模板得到 DNA 或 RNA 的酶（见 7.5 节和 7.10 节）。

一些病毒含有能帮助它们从宿主细胞释放的酶。例如，一些动物病毒包含神经氨酸酶（neuraminadase），这是一种能使动物细胞结缔组织的糖蛋白和糖脂中糖苷键断裂的酶，从而释放病毒粒子。因此，尽管大多数病毒缺乏它们自己的酶，但是这些包含酶的病毒却有很重要的缘由。如果缺乏这些酶，宿主细胞将不会产生病毒粒子。

概念检查

裸病毒粒子仅含有核酸和蛋白质，核酸在里面，整个单位叫做核衣壳。有囊膜的病毒在核衣壳外面还有一个或多个脂蛋白层。核衣壳以一种对称方式排列，病毒核酸外的结构亚单位有着精确的数目和排列。尽管病毒不能自主复制，但有些病毒含有一种或几种关键酶。

◆ 裸病毒和囊膜病毒的区别是什么？

◆ 特殊病毒粒子中能找到哪些种类的酶？

Ⅱ 生长与定量

9.3 病毒的宿主

由于病毒只能在活细胞内复制，因此病毒生长需要合适的宿主。在 3 种宿主类型——原核生物、植物和动物中，感染原核生物的病毒是最典型的易于在实验室中生长的。研究细菌病毒时，可通过液体或半固体（琼脂糖）培养基纯培养。植物病毒因为有时需要对整株植物进行研究，因而会显得很难处理。再者，植物比细菌生长得慢很多，并且植物病毒往往需要破开植物细胞很厚的细胞壁才能感染植物。大多数动物病毒和许多植物病毒能在组织或细胞培养中生长，这种培养形式使得对这些病毒的研究极为便利。

细胞培养

细胞培养是来自实验动物器官的细胞快速生长而获得的。具体方法是通过无菌操作取几块供试组织，用酶进行处理以打断细胞间的连接使细胞游离出来，然后将此悬液涂布于培养瓶（皿）底部。黏附在玻璃或塑料平皿上的细胞薄层叫做单层（monolayer），然后在它上面覆盖合适的培养基，可在合适的温度下继续培养（图 9.7）。用于细胞培养的培养基通常很复杂，含有多种氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖和碳酸氢盐缓冲体系。为使细胞生长得更好，有必要添加少量血清，并加入一些抗生素是为了防止细菌污染。

用这种方法得到的一些细胞培养可以传代培养并且无限生长，建立一种永久细胞系（permanent cell line）。这些细胞培养用于研究病毒是最方便的，因为细胞材料对于研究是持续有效的。在有些情况下并不发生无限生长，但是培养物仍能存活数天，这些培养物称为原代细胞培养（primary cell culture），尽管需要从新鲜的来源中不断地获得新培养是一个费钱和耗时的过程，但仍有助于病毒研究。有时原代和永久细胞系均难于获得，但整个器官或器官的一部分能够成功复制病毒。这些器官培养对研究病毒同样是有用的，因为它们能在或多或少可控制的实验条件下允许病毒生长。

概念检查

病毒只能在特定类型的细胞或整个生物体中复制。细菌病毒因其宿主易于培养和操作而更利于作为模型系统。许多动物和植物病毒能在培养的细胞内生长。

- 在病毒学中，什么是宿主？
- 为什么细胞培养对病毒研究有用？

9.4 病毒的定量

为了满足病毒学中多种目的，对混悬液中的病毒粒子进行数目定量很有必要。尽管可以通过电子显微镜直接数出毒粒的数目（图 9.4），但通常通过测定病毒感染宿主产生的效应来确定病毒的数量。在这里病毒感染单位（virus infectious unit）是指当病毒和敏感宿主混合时能产生可检测效应的最小单位。虽然大规模接种量是必需的，但有时也可以少至一个病毒粒子。为检测单位体积液体中感染单位的数量，可以用一种称为滴度的病毒定量方法（图 9.6）。

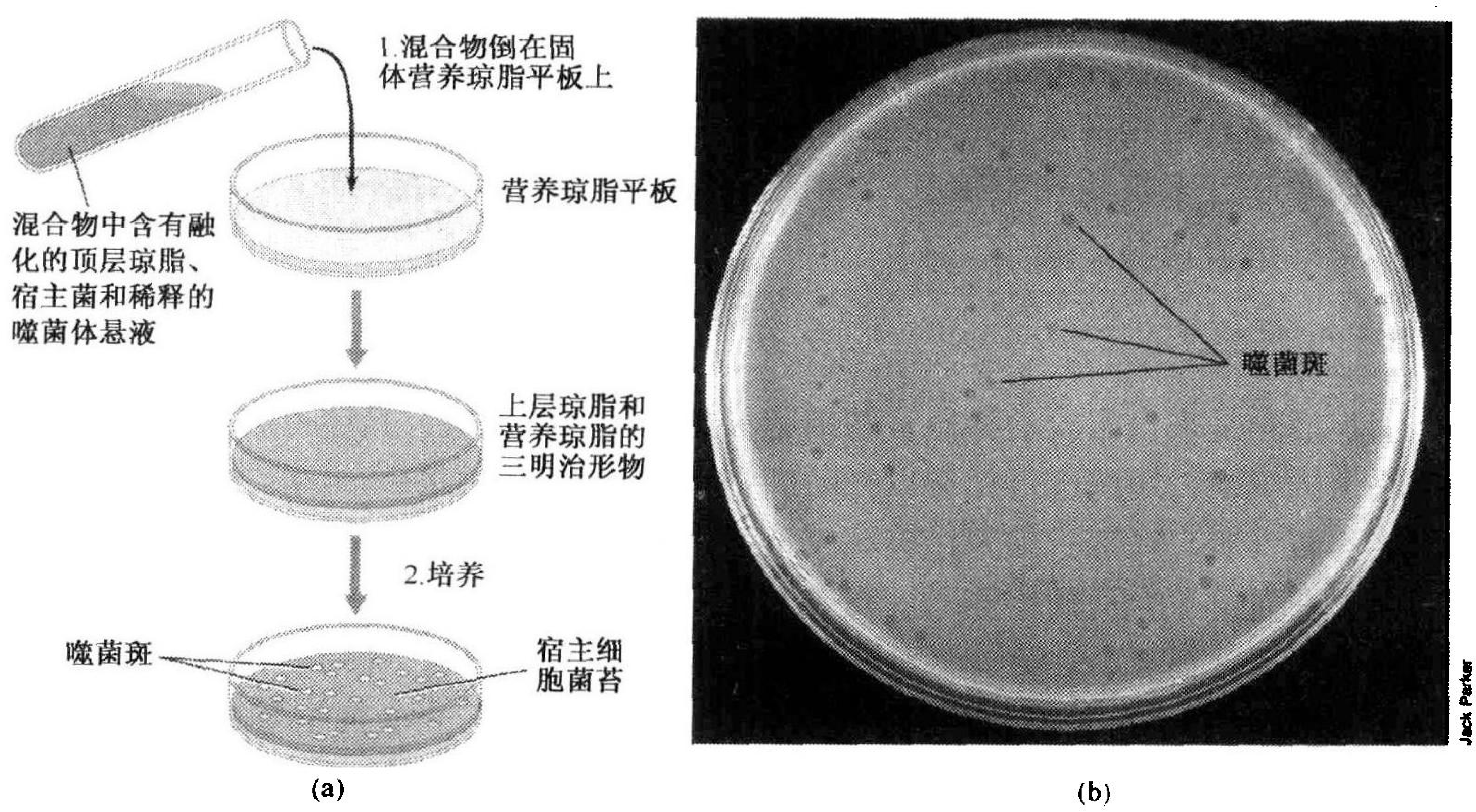


图 9.6 使用平板覆盖技术进行噬菌斑实验来对细菌病毒定量。（a）稀释的病毒材料悬浮液和敏感的宿主细菌及少量融化的琼脂混合，将混合物铺在营养琼脂平板表面。宿主菌均匀地铺满上层琼脂，开始生长，培养过夜后形成成片的菌苔。每个与细胞吸附并发生复制的病毒颗粒会造成细胞裂解。病毒颗粒释放出来并扩散到琼脂上邻近的细胞，感染并复制然后又导致裂解和释放。形成噬菌斑的大小取决于病毒、宿主和培养条件。（b）平板的照片显示噬菌体在敏感细菌菌苔上形成噬菌斑。噬菌斑的直径为 1～2mm。

噬菌斑测定

当病毒粒子开始感染平板上的宿主细胞层或菌苔时，会出现清亮的裂解圈，称为噬

菌斑（plaque），据推测每个噬菌斑是由一个病毒粒子的复制引起的。

噬菌斑就像是延伸成片的细胞层上的“窗”。对于噬菌体，当病毒颗粒与琼脂平板上的宿主细菌薄层混合后就能出现噬菌斑（图 9.6）。在培养过程中，细菌生长成为肉眼可见的混浊层，而当一个成功的病毒感染开始后，就会发生细胞裂解，导致噬菌斑的形成（图 9.6b）。通过计数噬菌斑形成单位可以计算出原始样品中的病毒感染数。

通过噬菌斑实验还能够分离到纯的病毒品系，因为如果一个噬菌斑是来自单一的一个病毒体，那么噬菌斑中所有病毒粒子在遗传学上都应该是相同的。从这个噬菌斑中挑取一些病毒粒子接种于新鲜细菌培养物中培养可获得一个病毒纯系。噬菌斑实验技术对于病毒学的发展就像当年柯赫（Koch）开发固体培养基对于微生物学纯培养那样重要（见 1.6 节）。

以动物细胞培养系统作为宿主可以获得动物病毒噬菌斑。在平板上生长的单层动物细胞上覆盖病毒悬液，动物细胞受破坏后会出现噬菌斑区域，通过产生噬菌斑的数目可以确定病毒滴度（图 9.7）。

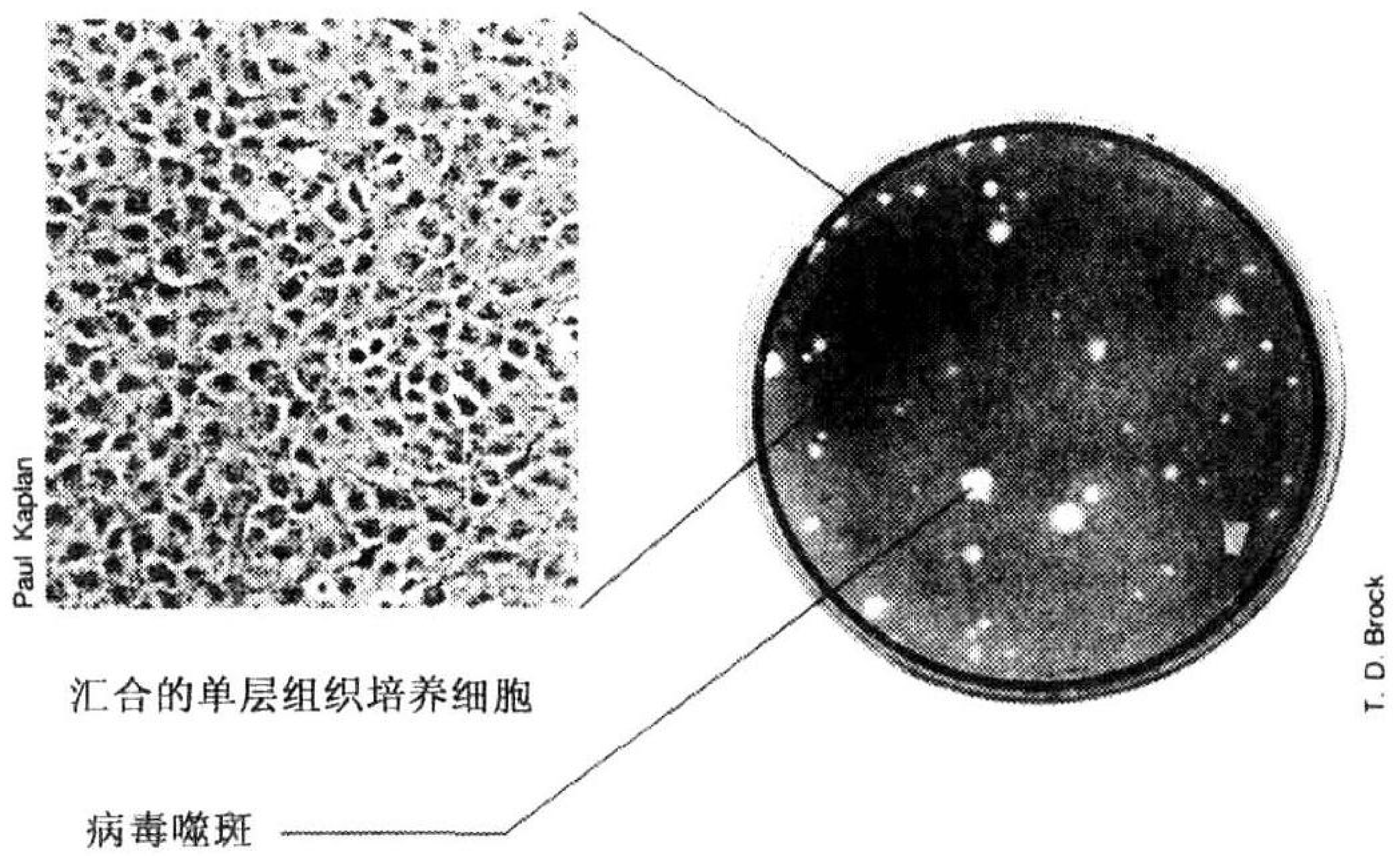


图 9.7　培养皿上的单层细胞培养。注意病毒诱导细胞裂解时出现的噬斑。左图显示了细胞培养的光学显微镜照片。

平板效率

病毒的定量中有一个重要的概念就是平板效率（plating efficiency）。在任何已知的病毒系统中，噬菌斑形成单位通常都会低于在电镜下对病毒悬液的计数。病毒感染的效率很难达到 100%，一般会相当低。这并不意味着没有引起感染的病毒粒子就是无活性的，尽管有时确是这样。这仅仅意味着在使用的感染条件下，这些粒子未发生成功地感染。细菌病毒的平板效率常高于 50%，而许多动物病毒的却很低，只有 0.1%或 1%。平板效率在病毒生长上很有用，因为它能够帮助计量究竟需要多大浓度的病毒悬液才能产生一定数目的噬菌斑。

动物个体测定方法

有些病毒并不引起细胞培养可见的效应，但能使动物个体死亡。这时只能通过对感

染动物进行滴定来进行病毒的定量。常用方法是将未知样品进行一系列稀释（见 6.5 节），一般是 10 倍稀释，然后将每个稀释度的样品注射给数只敏感动物。培养一定时间后，统计每个稀释度的死亡和存活动物的比率，计算出终点稀释度，即使得半数被注射动物死亡时的稀释度（即 LD_{50}，见 21.8 节）。尽管系列稀释法比细胞培养法更麻烦而且更不准确，但它们对某些类型病毒的研究很重要。

概念检查

尽管只需要一个病毒粒子就能起始一个感染循环，但并非所有病毒粒子都有相同的感染活性。测定病毒感染力的最准确方法之一是噬菌斑实验。噬菌斑是宿主细胞层上出现的清亮区域，每个噬菌斑都是由一个单一病毒粒子的感染引起的。病毒噬菌斑类似于细菌的菌落。

◆ 平板效率的定义是什么？

◆ 什么是噬菌斑形成单位？

Ⅲ 病毒的复制

9.5 病毒复制的基本特征

病毒要复制，就必须设法诱使活细胞产生较多病毒粒子的必需组分。这些组分必须要装配成新的病毒粒子，而且为了感染其他细胞，还必须从细胞中释放出来。噬菌体复制过程中的不同阶段可分为以下 5 个步骤（图 9.8）：

（1）病毒粒子吸附至敏感宿主细胞表面。

（2）病毒粒子或其核酸进入细胞。

（3）在病毒感染早期，利用宿主细胞代谢机制合成核酸和蛋白质。在感染晚期合成组成病毒衣壳的结构蛋白。

（4）衣壳粒的装配（有囊膜病毒膜组分的装配），以及核酸和衣壳装配成新的病毒粒子。

（5）成熟的病毒粒子从细胞中释放出来。

这些复制阶段始于病毒粒子感染细胞，如图 9.9 所示。病毒感染后的最初几分钟经历了一个隐蔽期（eclipse）。在这个时期，病毒核酸已经和蛋白质衣壳分离，所以即使此时破坏细胞，具有感染性的病毒粒子也不复存在。当新合成的核酸分子被装配在蛋白质衣壳里时，就进入成熟阶段，这时细胞中有活性病毒粒子的滴度急剧增加。但是，由于新合成的病毒粒子尚未出现在宿主细胞外，所以隐蔽期和成熟期也称为潜伏期（latent period）。

成熟期末，成熟的病毒粒子可依据病毒本身通过细胞裂解、出芽或分泌等过程释放出来。释放出的粒子数量，称为释放量或裂解量（burst size），这个值依病毒和宿主细胞的不同有很大变化，从几个到几千个。整个细菌病毒增殖循环的时间为 20～60min，

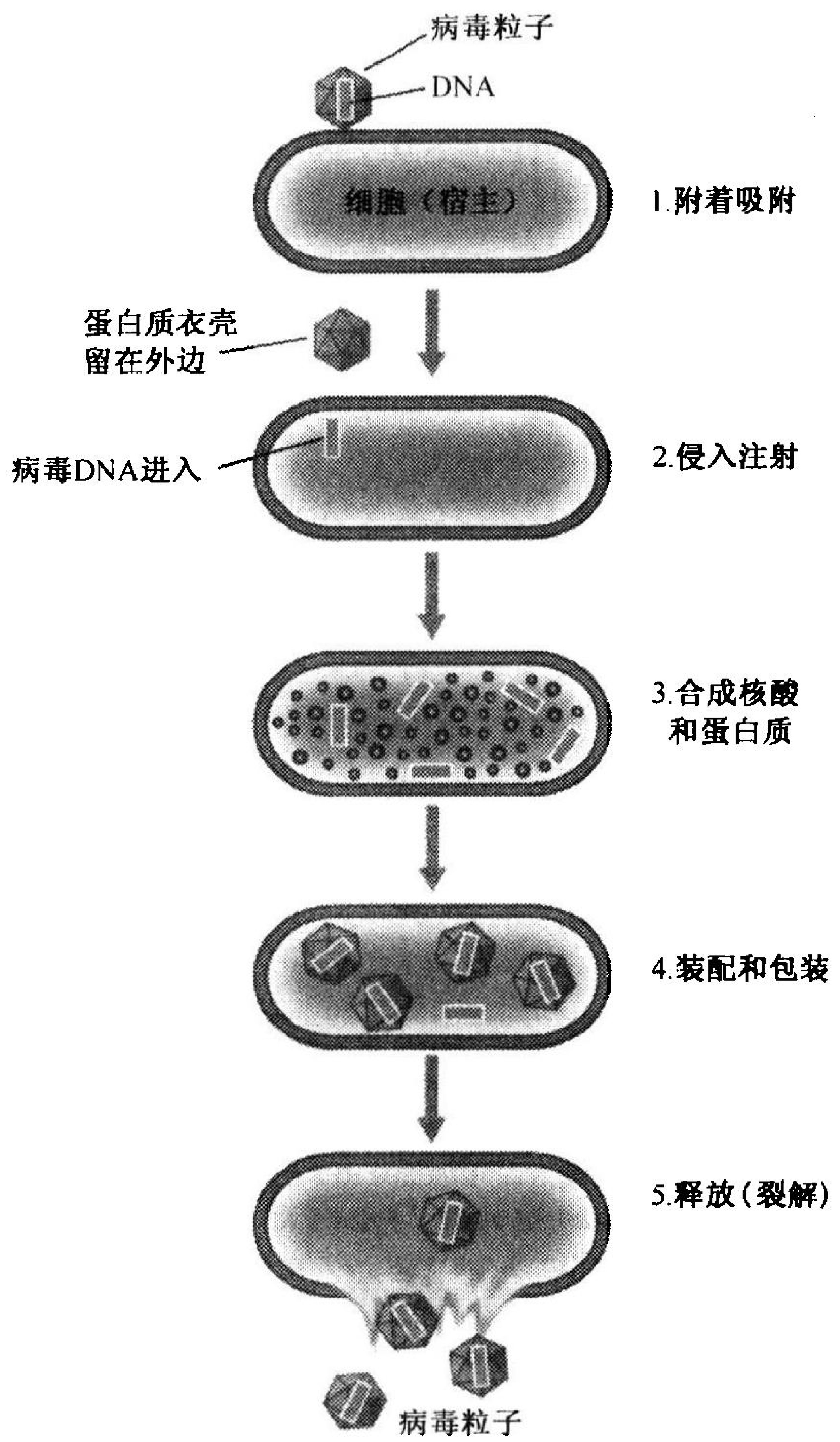


图 9.8　细菌病毒的复制循环。由此说明病毒复制的一般阶段。

大多数动物病毒为 8～40h。由于病毒粒子的释放几乎为一个同步过程，所以称病毒粒子经历了一步生长曲线（one-step growth curve）（图 9.9）。在下面两节中我们将详细讨论病毒增殖循环中的关键步骤。

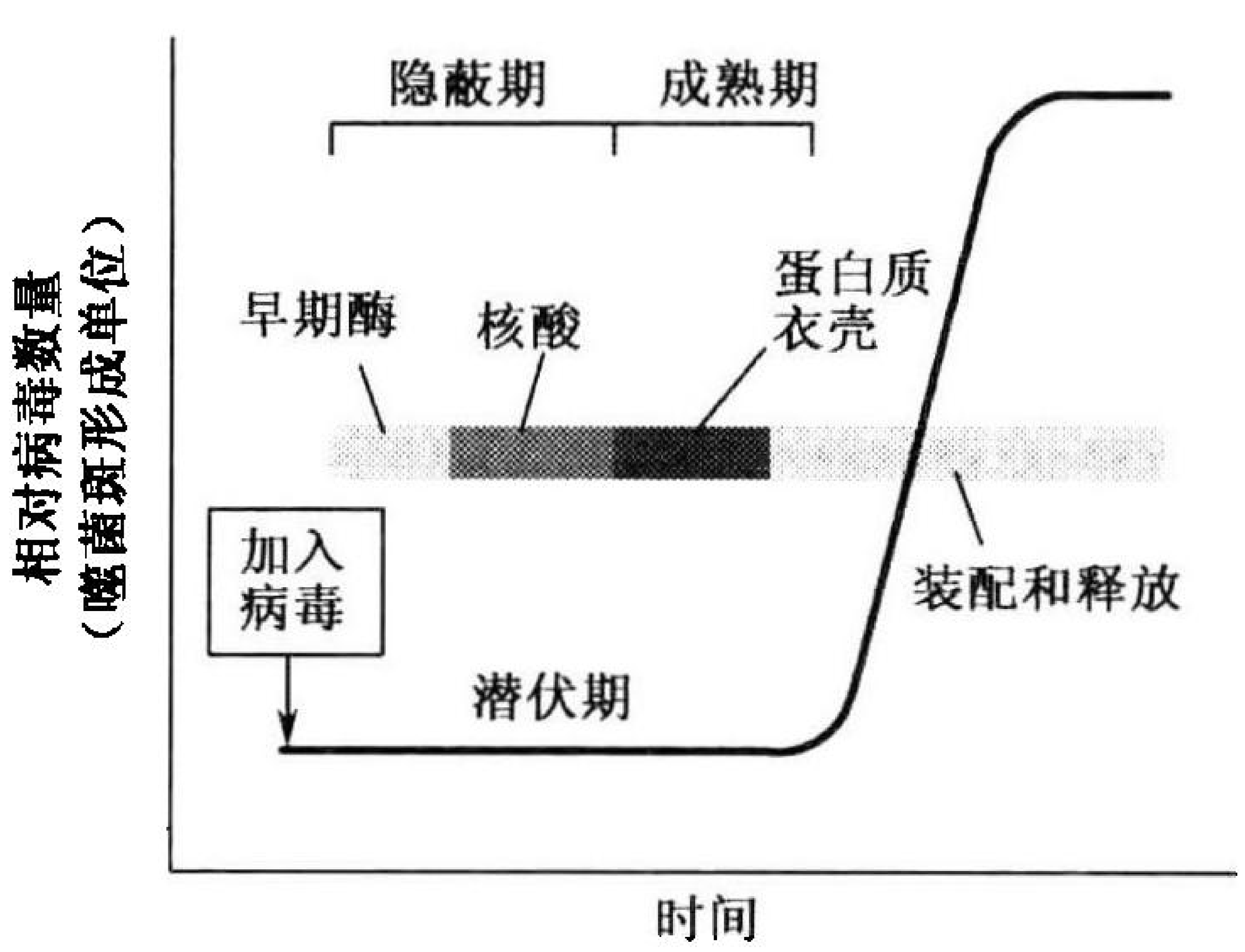


图 9.9　病毒复制的一步生长曲线。这张图表示在一个细胞群体中病毒复制一个循环的结果。吸附之后，病毒颗粒的感染力消失，这种现象称为隐蔽。这是由于病毒颗粒脱衣壳造成。在潜伏期，病毒核酸和蛋白质发生复制。接着是成熟期，即病毒核酸和蛋白质装配成新的病毒颗粒。这时，如果细胞被破坏，就能检测到有活性的病毒。最后，发生释放，细胞裂解或者不裂解。一步生长循环的时间依病毒和宿主的变化有所不同。请对比本图及图注与图 9.15 所示的噬菌体 T4 的特异复制过程的关系。

概念检查

病毒生活周期可以分为5个阶段：吸附、侵入、蛋白质和核酸合成、装配和包装、病毒粒子释放。

◆ 何种大分子物质被包装进入病毒粒子？
◆ 隐蔽期指的是什么？
◆ 在病毒复制的潜伏期主要发生了哪些反应？

9.6 病毒增殖：吸附和侵入

在这一节里我们重点讨论增殖的第一步：病毒吸附和侵入。另外，我们也会涉及一些细菌对噬菌体 DNA 侵入的反应机制。

吸附

病毒的宿主特异性最普遍基础是吸附（attachment）。病毒颗粒无论是裸露的还是有囊膜的，其表面均有一种或多种蛋白质，能够与特异细胞表面上称为受体的组分发生相互作用。受体是宿主细胞上正常的表面组分，如蛋白质、糖类、糖蛋白、脂类、脂蛋白或这些物质的混合物。病毒的受体在细胞中均执行正常功能。例如，T1 噬菌体的受体为一种铁吸收蛋白，而 λ 噬菌体的受体参与麦芽糖的吸收。动物病毒受体包括涉及细胞与细胞间识别或免疫系统的大分子。

如缺乏特异性受体，病毒则不能吸附，也就不能感染。如果受体位点发生了改变，如突变，那么宿主就对病毒感染产生了抗性。但是病毒也能够变异，形成能吸附到抗性宿主上的能力。另外，一些动物病毒可能有不止一种受体，因此失去了一种也不会阻止其吸附过程。

侵入

病毒吸附到宿主细胞会引起病毒和（或）宿主细胞的改变，从而导致侵入（penetration）的发生。病毒必须在细胞内复制，因此，至少病毒基因组要进入细胞（图 9.8）。但是，我们也曾提到过（见 9.2 节），对于一些病毒的复制，特定的蛋白质也要进入宿主细胞。需要重点指出的是，如果病毒基因组的信息不能被识别，那么即使在敏感宿主细胞上发生吸附和侵入也不会引起病毒增殖。能够允许病毒增殖的细胞对于这种病毒来说都是允许的（permissive）。

不同的病毒有不同的侵入策略。对于一些动物病毒，有囊膜病毒在细胞膜处并不脱膜，而是全部进入到宿主细胞中去。在这种情况下病毒必须逐渐脱去包装（部分或全部），从而使病毒基因组暴露，复制得以继续。一些病毒脱囊膜发生在细胞质中，而其他一些发生在核膜处。

有尾噬菌体的吸附和侵入

有细胞壁的细胞，如细菌，受感染的方式不同于没有细胞壁的动物细胞。最复杂的侵入机制见于感染细菌的病毒。这里用 *E. coli* 噬菌体 T4 为例说明。

细菌病毒 T4 的结构见图 9.5b。病毒粒子有一个头部，病毒线性的双链 DNA 折叠在头部里面，另外还有一个长的、相当复杂的尾部，尾部末端是一系列尾丝和尾针。在吸附过程中，病毒粒子首先用尾丝吸附于细胞上（图 9.10）。尾丝末端与 G^- 细菌细胞壁外层的多糖核心发生特异作用（见 4.8 节），然后尾丝收缩，尾髓通过尾部末端的一系列细的尾针与细菌细胞壁接触。一种类似溶菌酶的酶起作用形成小孔，尾鞘收缩，病毒 DNA 从尾尖通过小洞进入细胞，蛋白质衣壳留在细胞外面（图 9.10）。

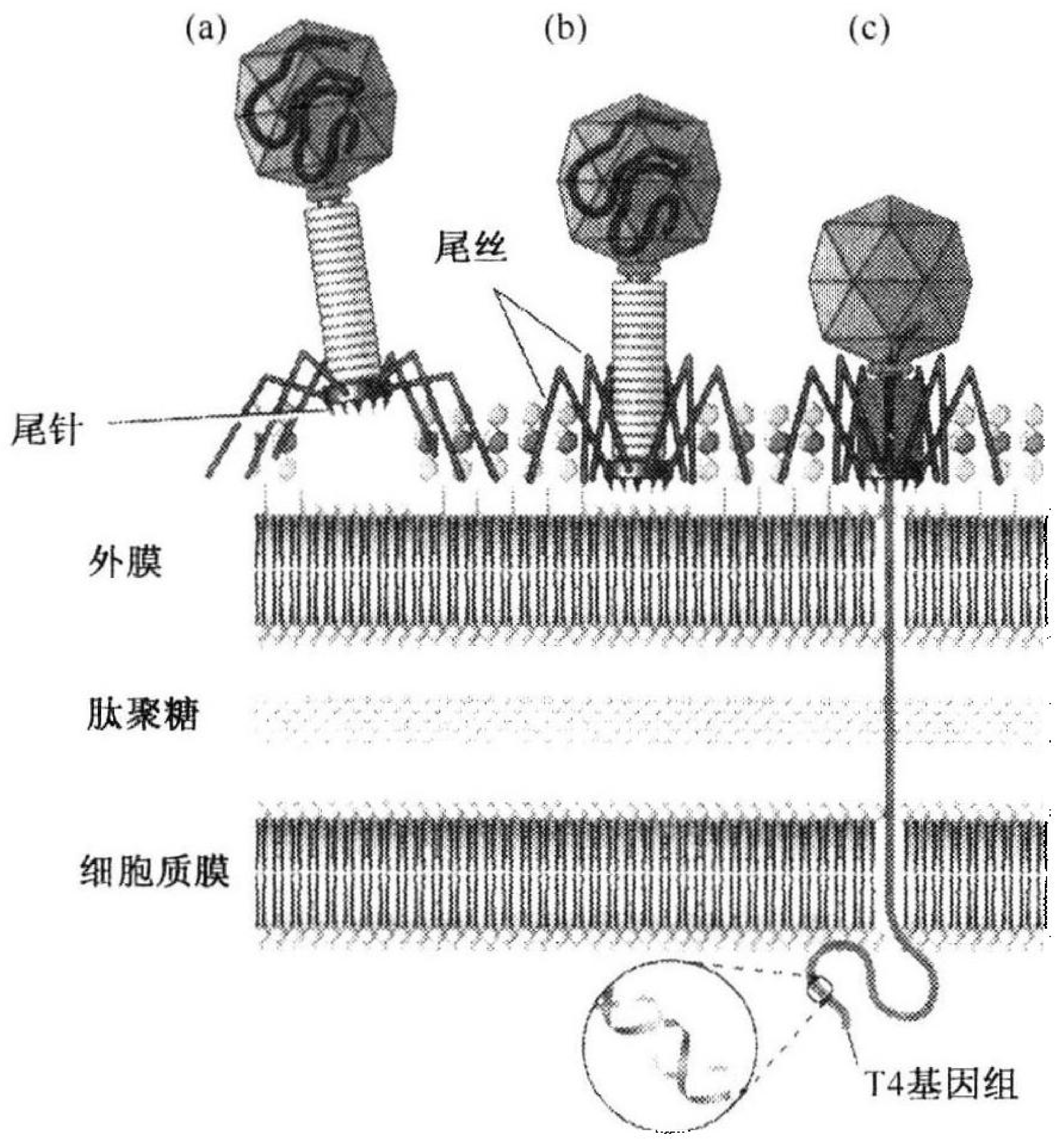


图 9.10 T4 噬菌体颗粒对大肠杆菌细胞壁的吸附和 DNA 的注入。（a）长的尾丝与核心多糖相互作用从而使病毒粒子吸附在细胞壁。（b）尾针接触细胞壁。（c）尾鞘收缩和 T4 基因组注入。革兰氏阴性细胞壁的详细描述见 4.9 节。

宿主对病毒的限制与修饰

动物通常能够借助各种免疫防御机制在感染扩散前，甚至有时在病毒侵入目的细胞以前就能够清除入侵的病毒。我们将在第 21 章和第 22 章节中讨论这些机制。而原核生物缺少这些防御机制。

但是，原核生物却具有特殊的 DNA 破坏系统，从而可以在病毒 DNA 注入后破坏病毒的双链 DNA。这种破坏是借助于宿主的限制性内切核酸酶来实现的（见 7.7 节），这种酶在一个或几个位置切割病毒 DNA，从而阻止病毒的复制。这一现象称为限制作用（restriction）。限制作用是宿主阻止外源核酸侵入机制的一部分。但是这种系统要想有效，宿主细胞必须有能够保护自身的机制。这可以通过对 DNA 上限制酶识别的位点

进行特殊的修饰实现（见 7.7 节）。

限制酶对双链 DNA 是特异性的，因此限制系统对于单链 DNA 病毒，以及所有的 RNA 病毒都不起作用。尽管，宿主细胞的限制系统代表着重要的保护作用，但是一些 DNA 病毒通过修饰它们自己的核酸使它们不再受限制酶攻击，从而逃逸宿主的限制机制。

现在已经知道病毒 DNA 有两种化学修饰作用，即糖基化作用和甲基化作用。例如，T-偶数噬菌体（T2、T4 和 T6）可将其 DNA 进行不同程度的糖基化作用，藉此糖基化作用阻止核酸酶对它的破坏作用。其他许多病毒的核酸是通过甲基化作用进行修饰。病毒核酸的修饰发生在基因组复制之后，通过病毒编码的蛋白质实现。其他一些病毒如噬菌体 T3、T7 通过编码一些蛋白质来抑制宿主的限制系统，免受限制作用。为了克服这种情况，有些宿主具有多种限制和甲基化系统，从而阻止那些能够抵抗其中一种作用的病毒的感染。

另外，宿主细胞为了使自身免受自身限制酶的攻击，还会含有其他 DNA 甲基化酶。其中一些参与 DNA 修复或基因调控，但还有一些是为保护宿主细胞免受外源限制性内切核酸酶的攻击。因为一些病毒能编码专门破坏宿主 DNA 的限制系统。不断地进化使得原核宿主与它们的病毒间的“猫抓老鼠”游戏更为激烈！

概念检查

病毒粒子吸附宿主细胞是一个高度特异性过程，这其中涉及敏感宿主细胞表面互补受体及感染性的病毒。宿主的限制修饰系统如果能识别和破坏外来双链 DNA，将使得宿主对病毒的感染具有抗性。

- 吸附过程是如何实现病毒与宿主的特异性的？
- 为什么有些病毒要在侵入后脱壳，而有些病毒却不需要？

9.7 病毒增殖：病毒核酸和蛋白质的合成

一旦感染了宿主细胞，病毒为了增殖，其基因组必须复制出新的拷贝，也必须合成病毒特异的蛋白质。至少有一部分蛋白质在病毒基因组被细胞吸收后的早期产生。为此，病毒必须首先合成特异的 mRNA。对于有些特殊的 RNA 病毒，其基因组本身就是 mRNA。但是对于大多数病毒，首先从 DNA 或 RNA 基因组合成 mRNA，而后基因组也必须复制。我们将在这里讨论这些重要过程。

Baltimore 病毒分类系统和 DNA 病毒

病毒学家 David Baltimore 曾因发现反转录病毒和反转录酶而获得了诺贝尔奖，他在基于病毒基因组和 mRNA 关系的基础上创立了一种病毒分类系统。在 Baltimore 病毒分类系统中（表 9.2），包含了 7 类病毒。双链 DNA 病毒为第Ⅰ类，虽然不同的病毒会使用不同的策略保证自己的 mRNA 优先于宿主细胞表达，但此类病毒的 mRNA 产生和基因组复制与宿主基因组相同。

表 9.2　Baltimore 病毒分类系统

分类	基因组特征和复制策略	举例	
		细菌病毒	动物病毒
Ⅰ	双链 DNA 基因组	λ、T4	疱疹病毒(herpesvirus)、痘病毒(pox virus)
Ⅱ	单链 DNA 基因组	ΦX174	鸡贫血病毒(chicken anemia virus)
Ⅲ	双链 RNA 基因组	Φ6	呼肠孤病毒(reovirus)(见 16.9 节)
Ⅳ	单链正链 RNA 基因组	MS2	脊髓灰质炎病毒(poliovirus)
Ⅴ	单链负链 RNA 基因组		流感病毒(influenza virus)，狂犬病病毒(rabies virus)
Ⅵ	复制需要 DNA 介导的单链 RNA 基因组		反转录病毒(retrovirus)
Ⅶ	复制需要 RNA 介导的双链 DNA 基因组		乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)

第Ⅱ类病毒为单链 DNA 病毒。在这类病毒的 mRNA 合成以前，首先必须合成一条互补的 DNA 链，因为 RNA 聚合酶需要以双链 DNA 为模板（见 7.8 节和 7.9 节）。这类病毒在复制过程中会形成双链 DNA 中间体，并且利用这些中间体进行转录（图 9.11）。双链 DNA 中间体的合成和逐步翻译都要借助于宿主细胞内的酶（尽管有时也会用到病毒蛋白）。双链中间体也用于复制基因组：其中一条链成为病毒的基因组而另一条被遗弃（图 9.11）。

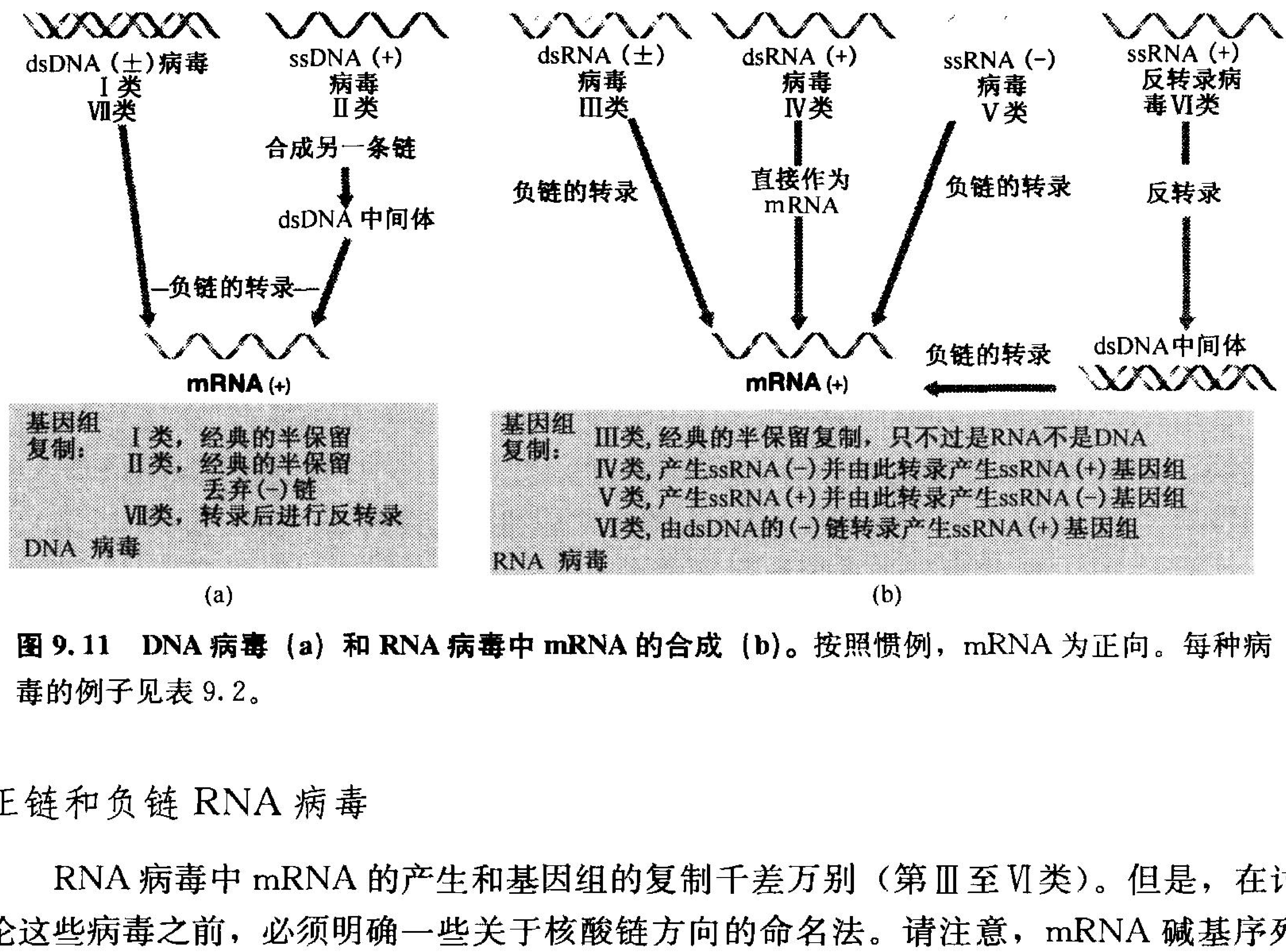


图 9.11　DNA 病毒（a）和 RNA 病毒中 mRNA 的合成（b）。按照惯例，mRNA 为正向。每种病毒的例子见表 9.2。

正链和负链 RNA 病毒

RNA 病毒中 mRNA 的产生和基因组的复制千差万别（第Ⅲ至Ⅵ类）。但是，在讨论这些病毒之前，必须明确一些关于核酸链方向的命名法。请注意，mRNA 碱基序列与其模板 DNA 链是互补的。按照病毒学的惯例，mRNA 为正链结构，与它互补的结构为负链结构。这种命名法也用于描述基因组包含 RNA 或 DNA 的单链病毒的基因组结

构（图 9.11）。例如，一种含有和它的 mRNA 序列相同的单链 RNA 基因组的病毒就为正链 RNA 病毒（positive-strand RNA virus）。一种含有和它的 mRNA 互补的单链 RNA 基因组的病毒就为负链 RNA 病毒（negative-strand RNA virus）。那么这些病毒是如何复制呢?

细胞内的 RNA 聚合酶指导 RNA 的合成不是以 RNA 为模板而是以 DNA 为模板。因此，RNA 病毒无论是正链、负链或双链都需要特殊的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。最简单的情况是正链的 RNA 病毒（第Ⅳ类），它们的基因组是正向的，因此能直接作为 mRNA（图 9.11）。除了其他必需的蛋白质外，mRNA 将编码病毒特异性的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（也称为 RNA 复制酶）。一旦合成以后，这种聚合酶首先合成 RNA 的互补负链，然后再以它们为模板合成更多的正链。这些合成的正链既可以作为 mRNA 进行翻译，也可以作为基因组包装进新合成的病毒粒子中（图 9.11）。

对于负链 RNA 病毒（第Ⅴ类）或双链 RNA 病毒（第Ⅲ类），情况更为复杂。由于它们的 RNA 均不能作为 mRNA，因此首先要合成 mRNA。但是，前面曾提到过，细胞内不具有能行使这种功能的 RNA 聚合酶。为了克服这个问题，这些病毒在它们的病毒粒子中包含这种酶，并且，它们也随 RNA 基因组一并进入细胞。因此，在这种情况下，通过 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶合成 RNA 的互补正链并且作为 mRNA。正链 mRNA 也作为模板去合成更多的负链基因组（图 9.11）。

反转录病毒

反转录病毒［某些癌症和获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的病原体］是 RNA 动物病毒，在复制时以 DNA 为中间体（第Ⅵ类）。遗传信息由 RNA 传递到 DNA 的过程称为反转录（reverse transcription），这些病毒所需的酶也就称为反转录酶（reverse transcriptase）。尽管反转录病毒进入细胞的是正链 RNA，但它并不作为信使，因此这些病毒在它们的病毒粒子中必须携带反转录酶。感染之后，病毒的单链 RNA 通过一个单链 DNA（ssDNA）中间体被拷贝成双链 DNA（dsDNA），双链 DNA 然后再作为模板合成 mRNA（即 ssRNA→ssDNA→dsDNA→mRNA）。

最后，第Ⅶ类病毒在它们的病毒粒子中具有双链 DNA 但是却通过 RNA 中间体进行复制。这些特殊的病毒也会用到反转录酶（见 16.15 节）。尽管这些病毒的 DNA 复制很特殊（图 9.11），但它们产生 mRNA 的方式却和第Ⅰ类病毒一样（见 16.15 节）。

尽管 Baltimore 病毒分类系统看起来像涵盖了所有的可能性，但仍有例外。例如，双向病毒（ambivirus）包含单链 RNA 基因组，其中一半为正方向（可以作为mRNA）而另一半则为负方向（不能作为 mRNA）。后半部分（负链）在进行翻译之前首先要合成互补链。进化显著地增加了病毒的多样性。

病毒的蛋白质

一旦病毒的 mRNA 产生（图 9.11），病毒蛋白（如酶和结构亚基）就能够合成。病毒感染后蛋白质的合成可以被分成 2 个大类：

（1）感染后立即合成的蛋白质，称为早期蛋白（early protein），是核酸复制所必需的。

(2) 晚期合成的蛋白质，称为晚期蛋白（late protein），包括衣壳蛋白等。

通常，病毒蛋白质出现的时间和数量受到高度调控。早期蛋白多是有催化作用的酶类，只少量合成。相反，晚期蛋白通常是病毒粒子的结构组分，将大量合成。

病毒感染明显地打乱了宿主的调控机制，因为在被感染细胞中，核酸和蛋白质均显著地过量合成。某些情况下，病毒的感染使宿主大分子合成完全关闭。而在另一些情况下，宿主的合成与病毒的合成同时发生。无论是哪种情况，病毒合成的调节都是在病毒的控制下，而不是由宿主控制的。这种控制中的有些部分类似于第 8 章中讨论的宿主调控机制，但也存在某些特异的病毒调控机制。我们在病毒各论中会将详述各种不同的调控机制。

概念检查

在病毒核酸复制发生之前，必须有新的病毒蛋白质。这些蛋白质由病毒基因组转录得到的 mRNA 编码。在一些 RNA 病毒中，病毒的 RNA 本身就是 mRNA。而在其他病毒中，病毒的基因组为合成病毒 mRNA 的模板，并且这时在病毒粒子中包含必需的转录酶。

◆ 为什么有些病毒在产生 mRNA 时病毒粒子中要包含酶?

◆ 如何区别正链 RNA 病毒和负链 RNA 病毒?

◆ 在正链病毒和反转录病毒中都包含正向结构的 RNA 基因组，比较这两类病毒中 mRNA 的产生过程。

Ⅳ 病毒的多样性

9.8 细菌病毒概述

噬菌体具有多样性，各类细菌病毒的例子如图 9.12 描述。多数研究得较为详细的细菌病毒的宿主是肠道细菌，如大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）。其实，病毒能感染多种原核生物，包括细菌和古生菌。

目前研究得较为透彻的噬菌体大多数具有双链 DNA 基因组，一般认为这种类型的病毒在自然界中存在最普遍。但是，也有许多其他类已知病毒，包含单链 RNA 基因组、双链 RNA 基因组和单链 DNA 基因组（图 9.11）。

少数细菌病毒有囊膜，大多数没有。不过，许多细菌病毒的结构很复杂。图 9.12 中例举的具有双链 DNA 基因组的噬菌体都有尾巴。噬菌体 T2、T4 和 Mu 的尾部具有收缩性并且能将核酸注入宿主细胞内（图 9.10）。相反，λ 噬菌体的尾部是可弯曲的。

这些有尾细菌病毒最初成为研究病毒增殖基本特征的模式系统，其中一些现在仍是基因工程的便利工具。因此，对细菌病毒的认识不但对有助于了解动物病毒，对后面两章介绍的微生物遗传学（见第 10 章）和基因工程（见第 31 章）部分也很有帮助。

在这章的下面两小节中我们将简要介绍病毒生活周期中的两种不同类型：烈性感染

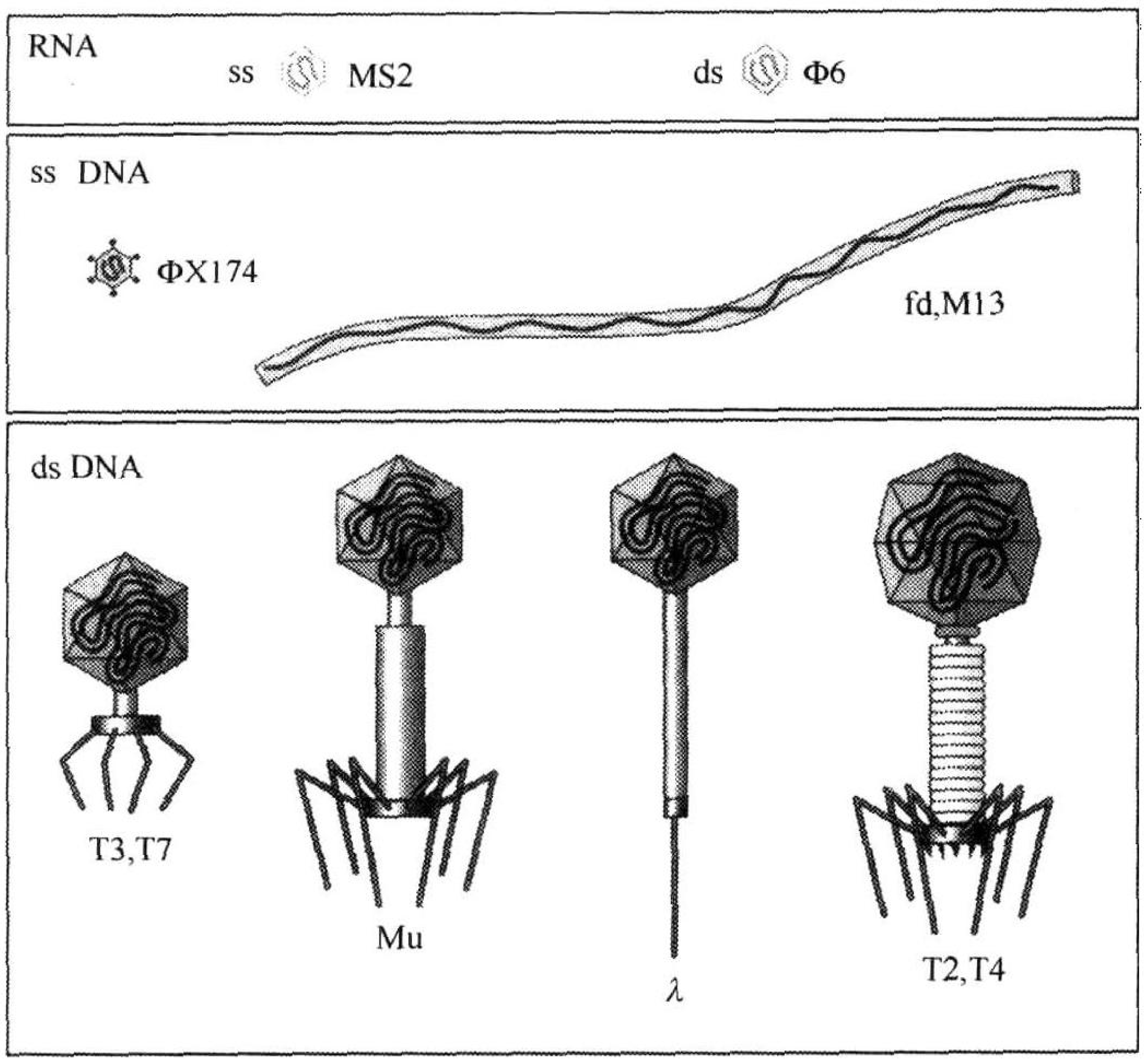


图 9.12 细菌病毒主要类型模式图。本章或者在第 16 章详细讨论了 M13、ΦX174、MS2、T4、λ、T7 和 Mu，大小为近似比例，其中 Φ6 的核衣壳有膜包裹。

和温和感染。烈性病毒在进入到宿主细胞中后将裂解或杀死宿主，而温和病毒感染后能形成其基因组随宿主基因组一起复制而不杀死宿主的状态。

概念检查

细菌病毒或噬菌体具有多样性。研究最多的噬菌体感染肠道细菌，如大肠杆菌，其结构复杂，包括头部、尾部和其他组分。

◆ 噬菌体基因组最普遍的类型是什么？

9.9 烈性噬菌体和 T4

早期研究较深入的是一些感染 *E. coli* 和其相关细菌的噬菌体，它们具有线状双链 DNA 基因组。病毒学家分离到这些病毒，并将它们作为模式系统进行研究，是为了研究病毒复制和利用它们确立分子生物学和遗传学上的许多基础原理。这些噬菌体被命名为 Tl、T2 等，直到 T7。在本章我们已经简要提到了这些病毒中的一种——T4 是如何吸附到它的宿主上以及如何将它的 DNA 侵入宿主（见 9.6 节，图 9.10）。在这一节我们将要详细介绍这类病毒以说明烈性病毒的复制周期。

T 偶数噬菌体的基因组

噬菌体 T2、T4 和 T6 都是很相似的病毒，其中 T4 研究得最为深入。T4 粒子的结构较为复杂（图 9.5b）。它有一个二十面体的头部，整个头部的大小约为 85nm×

110nm。头部连接着一个复杂的尾巴，尾巴由一个螺旋状的管子组成（25nm×110nm），与外鞘、有“领”的“颈部”、基盘以及长长的尾丝相连（图 9.5b）。整个病毒颗粒总共有 25 种不同类型的蛋白质。

T4 的基因组是线性双链 DNA 分子，大小为 168 903bp。T4 基因组编码超过 250 种不同的蛋白质，虽然人们尚未发现病毒能够编码其自身的翻译组件，但 T4 的确可以编码几种它自己的 tRNA。虽然 T4 基因组为独特的线性序列，但每个病毒粒子内的基因组间并不完全相同。这可能是因为 T4 噬菌体的 DNA 是环状可变的。环状可变的分子通过产生一个切口变为线性，但是切口在不同的位置。除了环状可变外，每个 T4 病毒粒子中的 DNA 在它们的末端都具有 3～6kb 的重复序列。这些都将影响基因组的包装。

具有末端冗余的 T4 DNA，在感染一个宿主细胞后最初以个体为单位进行复制，然后几个基因组单位通过末端和末端结合在一起，形成一种长的 DNA 分子称为多联体（concatemer，图 9.13）。T4 DNA 的包装机制为将多联体切割成足以使头部进行包装的 DNA 分子片段（至少病毒大小），而不是在长分子上识别特异的位点。这种“头部包装机制”导致了环状多变和末端冗余。T4 DNA 包含修饰后的碱基 5-羟甲基胞嘧啶而不

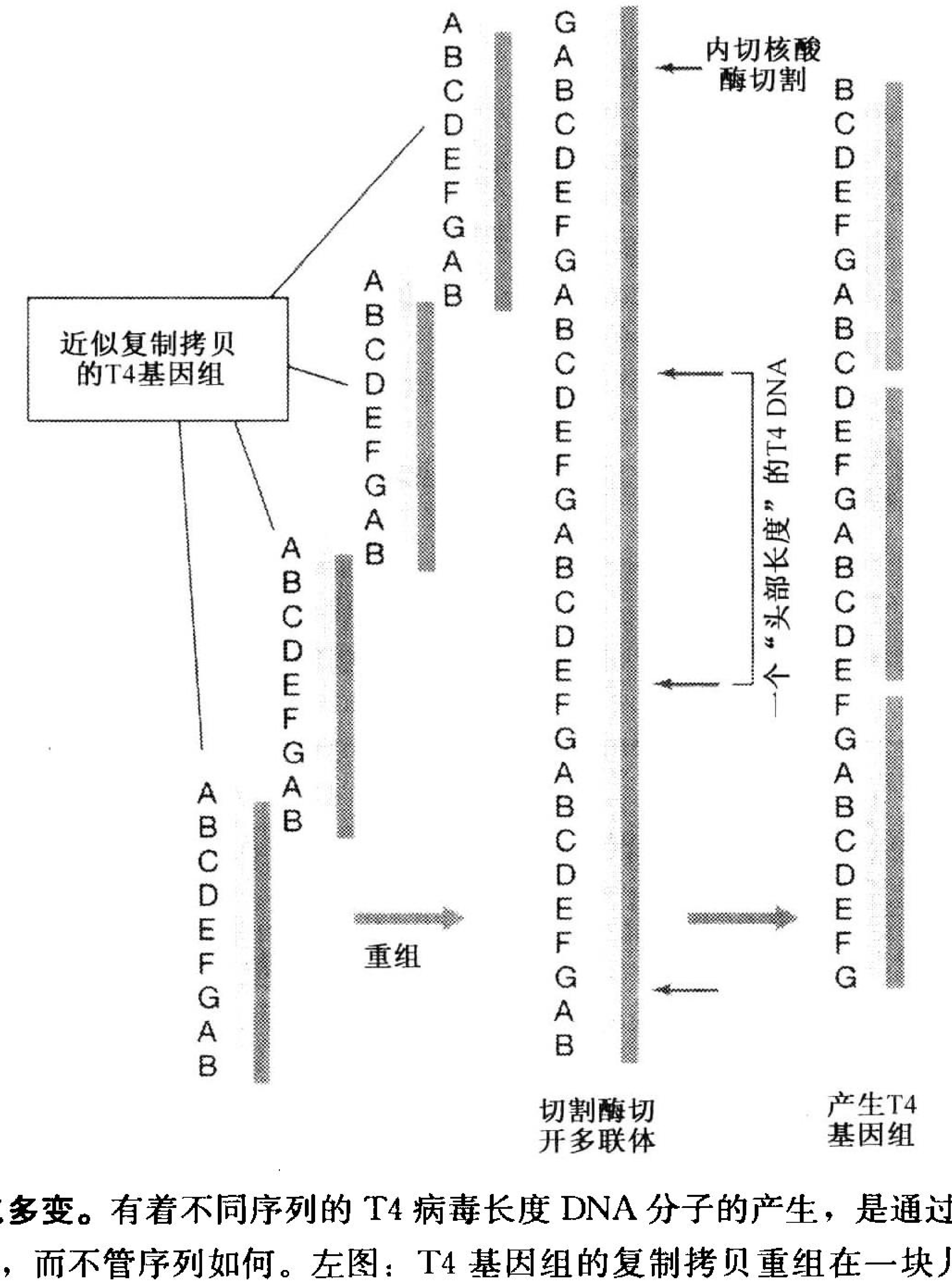


图 9.13　环化多变。有着不同序列的 T4 病毒长度 DNA 分子的产生，是通过内割酶切下 DNA 上固定的长度，而不管序列如何。左图：T4 基因组的复制拷贝重组在一块儿形成多联体；中间图；箭头示限制酶切位点；右图：产生的分子。需要注意右侧包含 A-G 基因在内的基因组是如何形成 T4 基因组的，其中每个分子的末端却不同。

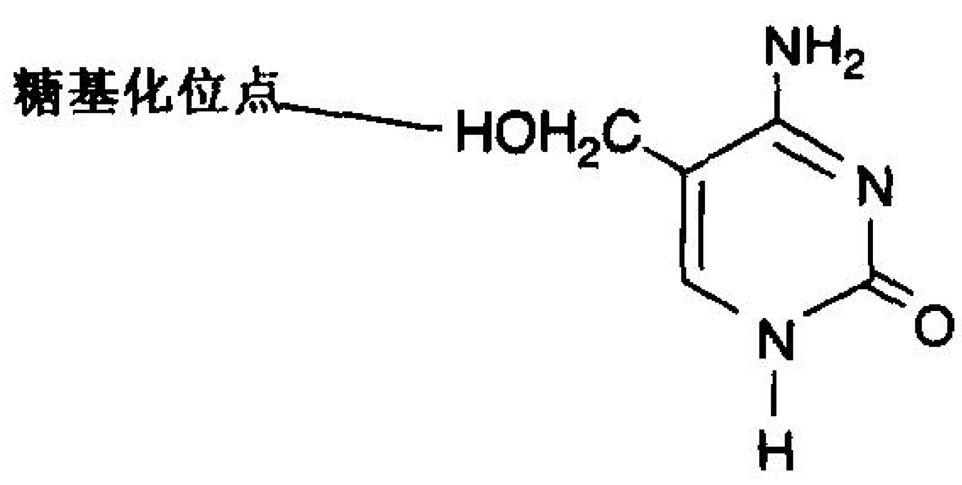


图 9.14 T 偶数噬菌体的 DNA 中的异常碱基，5-羟甲基胞嘧啶。糖基化位点已表示出来。

是胞嘧啶（图 9.14）。5-羟基胞嘧啶的羟基基团可以被葡萄糖基修饰（见 9.6 节）。这种糖基化的 DNA 几乎对宿主所有的限制性内切核酸酶都有抗性。可见这种病毒特有的 DNA 修饰作用对于病毒感染宿主起着很大的作用。

T4 感染后的过程

T4 感染后过程发展很快。T4 感染后早期直接合成它自己的 RNA 和复制它自己的 DNA（图 9.14）。T4 吸附后和将自己的 DNA 注入宿主细胞后，1min 以后宿主的 DNA 和 RNA 合成就停止，而噬菌体特异的转录开始。不久病毒的 mRNA 开始翻译，大约在感染后 4min，噬菌体 DNA 开始复制。

T4 基因组可被分为 3 类：分别是编码早期蛋白、中期蛋白和晚期蛋白（图 9.15）。早期和中期蛋白多为 DNA 复制和转录中的初始酶类，而晚期蛋白为头部和尾部蛋白，以及一些涉及将成熟噬菌体颗粒从细胞中释放的酶类。T4 感染后的时间进程如图 9.15 所示。

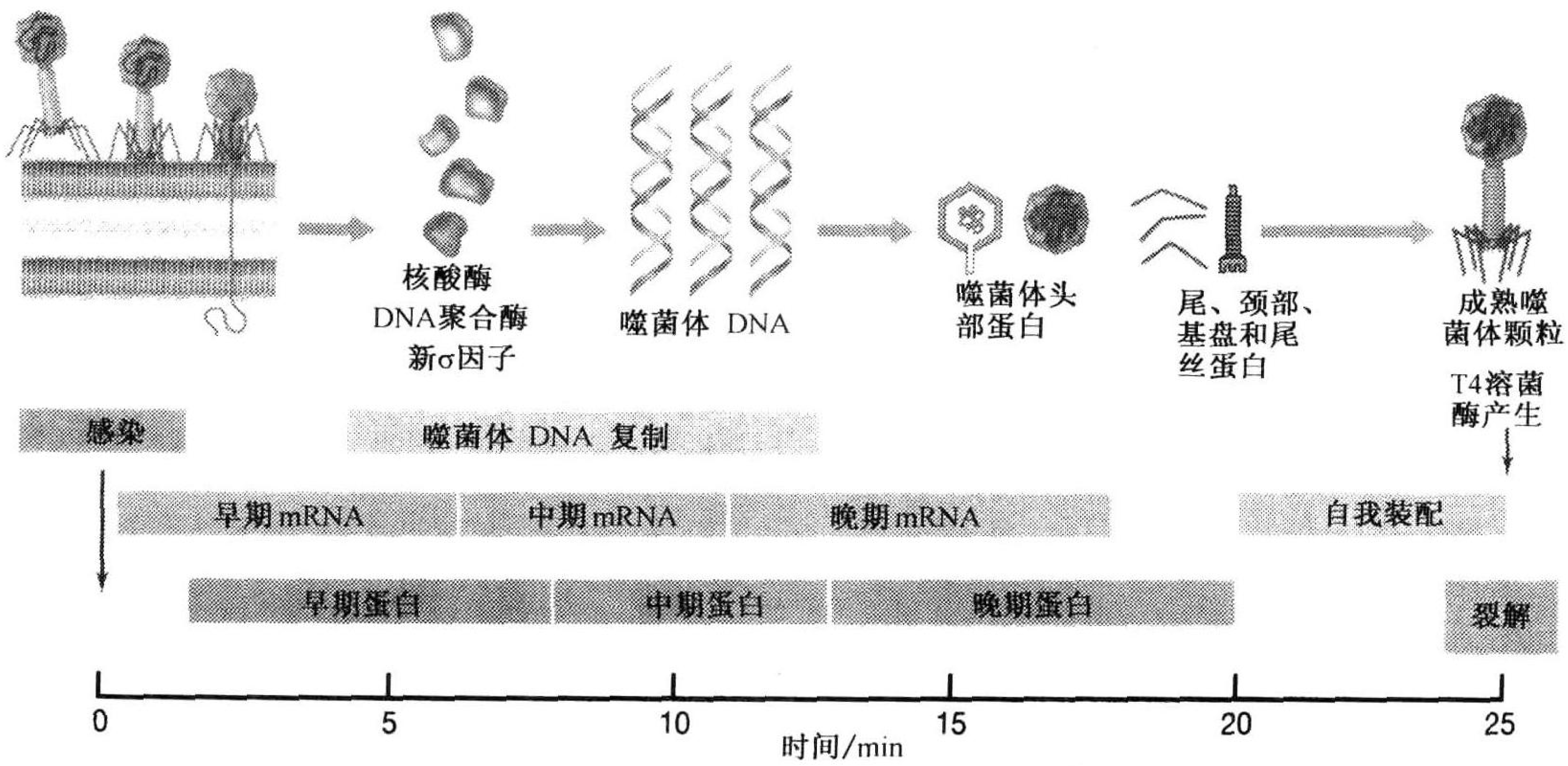


图 9.15 T4 噬菌体感染后的时间进程。DNA 注入以后，早期和中期的 mRNA 产生了，它们将编码核酸酶、DNA 聚合酶、新的噬菌体特异性的 σ 因子，以及关于 DNA 复制的蛋白质。晚期的 mRNA 编码噬菌体病毒颗粒的结构蛋白以及 T4 的溶菌酶，溶菌酶具有使细胞裂解从而使新的噬菌体颗粒释放的作用。

虽然 T4 的基因组对于病毒来说已可谓巨大，但它并不编码自己的 RNA 聚合酶。T4 对 mRNA 合成的控制是通过产生一种蛋白质不断对宿主的 RNA 聚合酶进行特异性修饰来进行的，使其只能识别噬菌体的启动子。T4 的早期启动子能直接被宿主 RNA 聚合酶识别，此时宿主的 σ 因子发挥作用。之后，噬菌体编码一种能和宿主 σ^{70} 结合的抗 σ 因子（见 8.9 节）从而干扰了它对宿主启动子的识别，使得宿主的转录被迅速关闭。

病毒早期基因合成的一些特异性蛋白质能共价修饰宿主 RNA 聚合酶的 α 亚基（见 7.10 节），同时一些病毒编码的蛋白质也会结合到聚合酶上。这些修饰改变了聚合酶的特异性使得它可以识别 T4 的中期启动子。T4 的早期蛋白质之一——MotA，能识别中期启动子上的一段特殊的 DNA 序列从而将 RNA 聚合酶引导到这些位点。晚期启动子的转录需要 T4 新编码的 σ 因子。T4 的这种通过对细胞中 RNA 聚合酶的顺序修饰以调控基因表达也适用于其他的噬菌体。

在感染的早期 T4 能编码 20 多种新蛋白质。其中包括合成这些特殊碱基 5-羟甲基胞嘧啶的酶（图 9.14），转葡糖基酶以及那些降解正常的脱氧胞嘧啶三磷酸前体的酶。另外，T4 还编码一些与宿主 DNA 复制酶功能相似的酶，只不过这些酶会被大量合成，能使 T4 DNA 的合成加快。除此之外，早期蛋白中还含有一些能对新复制的噬菌体 DNA 进行加工的蛋白质（图 9.13）。

大多数的晚期基因编码病毒粒子的结构蛋白，包括头部和尾部。其中头部和尾部的包装是相互独立的，DNA 先包装进装配好的头部（图 9.15），然后尾部和尾丝加上去。病毒从细胞中释放会导致细胞裂解。噬菌体将编码一种裂解酶——T4 溶菌酶，它将破坏宿主细胞的肽聚糖。经历了一个裂解周期，大约 25min（图 9.15），每个宿主细胞将释放 100 多个新的病毒粒子，而宿主细胞本身几乎已经完全被破坏。

概念检查

T4 的病毒粒子吸附到宿主细胞并且将 DNA 侵入到细胞质中以后，病毒基因的表达借助于宿主的合成机制从而合成病毒的核酸与蛋白质。新的病毒粒子随后被装配并且通过细胞裂解释放出来。T4 具有双链的 DNA 基因组，它的基因组是环化多变和末端冗余的。

◆ T4 噬菌体的基因组的环化多变和末端冗余各代表什么？

◆ 举例说明 T4 噬菌体中确保仅是病毒本身的基因组而不是宿主进行转录的机制。

9.10 温和噬菌体

噬菌体 T4 是烈性的。但是，其他一些病毒尽管也可以通过裂解周期杀死细胞，但也可以选择一种不同的生活周期从而和宿主达到稳定的遗传关系。这类病毒称为温和病毒（temperate virus）。这类病毒能进入一种状态称为溶原态（lysogeny），这时多数病毒基因都是不表达的，病毒基因组与宿主染色体同步复制，这时的病毒称为原噬菌体（prophage）。

温和噬菌体的基因组在细胞分裂时与宿主的遗传物质一起复制，并且从细菌的一代传给下一代。处于这种状态的含有温和病毒的细菌称为溶原菌（lysogen），它可以自发地再生成和释放温和噬菌体粒子。

溶原化可能有着重要的生态学意义，因为从自然界中分离出的大多数细菌都是一种或多种噬菌体的溶原菌。溶原态也赋予了细菌细胞新的遗传特性，我们在后面的章节中将会看到一些例子：一些烈性致病菌之所以致病至少有部分原因是因为他们携带有溶原

性噬菌体。溶原并不仅限于噬菌体，许多动物病毒和它们的宿主之间也有着类似的关系。

温和噬菌体生活史概述

在有代表性的裂解病毒中，并非病毒 DNA 的存在（甚至其复制）导致新的病毒粒子产生和宿主细胞死亡，而是病毒基因组表达才对宿主细胞有害。可以想象如果病毒基因的表达可以控制，那么宿主细胞就能够保持病毒基因组对细胞无害的状态，在溶菌中就是这种情况。不过，一旦失去这种控制，病毒进入裂解途径（lytic pathway），就能产生新的病毒粒子，然后宿主细胞发生裂解。因此溶原态被认为是细菌菌株的遗传特性。

图 9.16 显示温和噬菌体生活史概况。温和性病毒在细胞内不以它的胞外形式存在，而是整合到细菌染色体当中，只要控制其裂解途径的基因不表达，原噬菌体便与宿主基因同步复制。这种控制通常是由噬菌体编码的阻遏蛋白完成（说明至少这些基因是表达

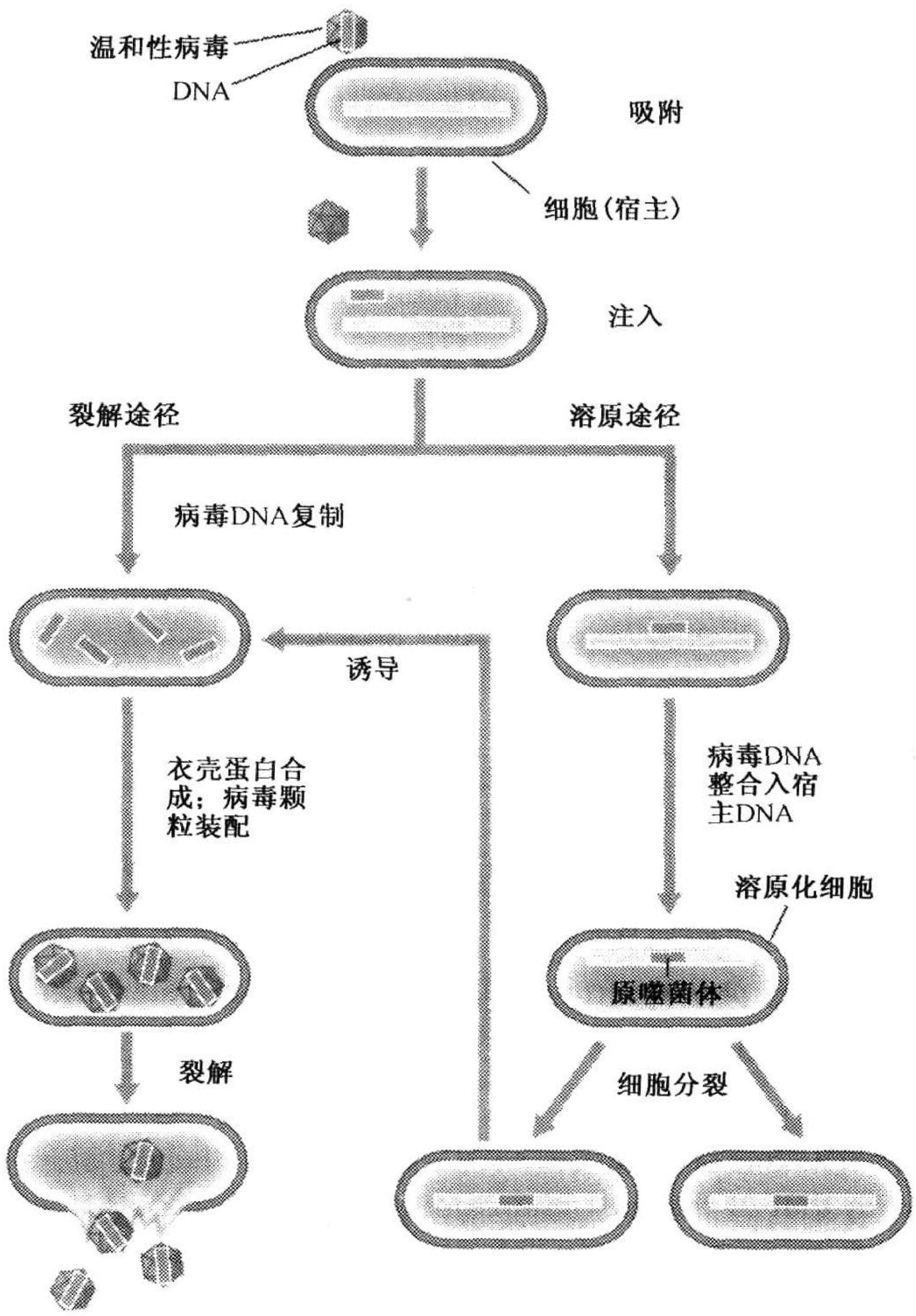


图 9.16 温和噬菌体感染的生活史。感染后，或者是病毒 DNA 整合进宿主 DNA（溶原化），或者是进行复制并释放成熟病毒（裂解）。溶原化细胞也能被诱导产生成熟病毒并且裂解。

的)。病毒的阻遏蛋白不但抑制原噬菌体中裂解基因的表达，还阻遏新进入细胞的相同病毒基因组的表达，因此溶原菌对同种类型病毒的感染具有免疫力。

如果这种阻遏因子失活，或者它的合成被阻断，那么原噬菌体可以被诱导（图 9.16)，产生新的病毒粒子并裂解细胞。有时环境条件也可以进行诱导。如果病毒（因为突变）失去了从宿主基因组中游离出来的能力，它就成为一种隐蔽病毒。遗传研究表明（见第 15 章）许多细菌基因组含有病毒基因组的片段。因此溶原状态的建立或打断在原核生物中更像是一种动态的过程。

下面将重点讨论溶原特性研究得较为详细的噬菌体——λ 噬菌体。

概念检查

溶原态是一种病毒基因组整合进宿主染色体并且裂解反应被抑制的状态。能导致溶原状态的病毒称为温和性病毒。在溶原态，病毒基因组称为原噬菌体；但是，在一定环境因子的刺激下仍可以导致裂解发生。

◆ 对于温和性病毒，这两种途径有什么用处？

◆ 带有温和性病毒的宿主具有什么优势？

9.11 λ 噬菌体

λ 噬菌体能感染 *E. coli*，是研究得最为深入的温和噬菌体。和其他温和性病毒一样，裂解和溶原化途径都是必需的（图 9.16)。λ 噬菌体的形态虽然不像 T4 噬菌体，它没有尾丝，但还是与大多数有尾噬菌体相似（图 9.17，图 9.12)。λ 的基因组是一条线性双链 DNA 分子，但是在每条链的 5′端都有一个长 12 个核苷酸的单链尾巴。单链末端是互补的（称为黏性末端）。由此，当 DNA 的两个末端在宿主细胞中处于游离状态时能连接起来（*cos* 位点)，DNA 形成一个双链的 48 502bp 的环。图 9.18 显示了这个过程和 λ 的遗传图谱。

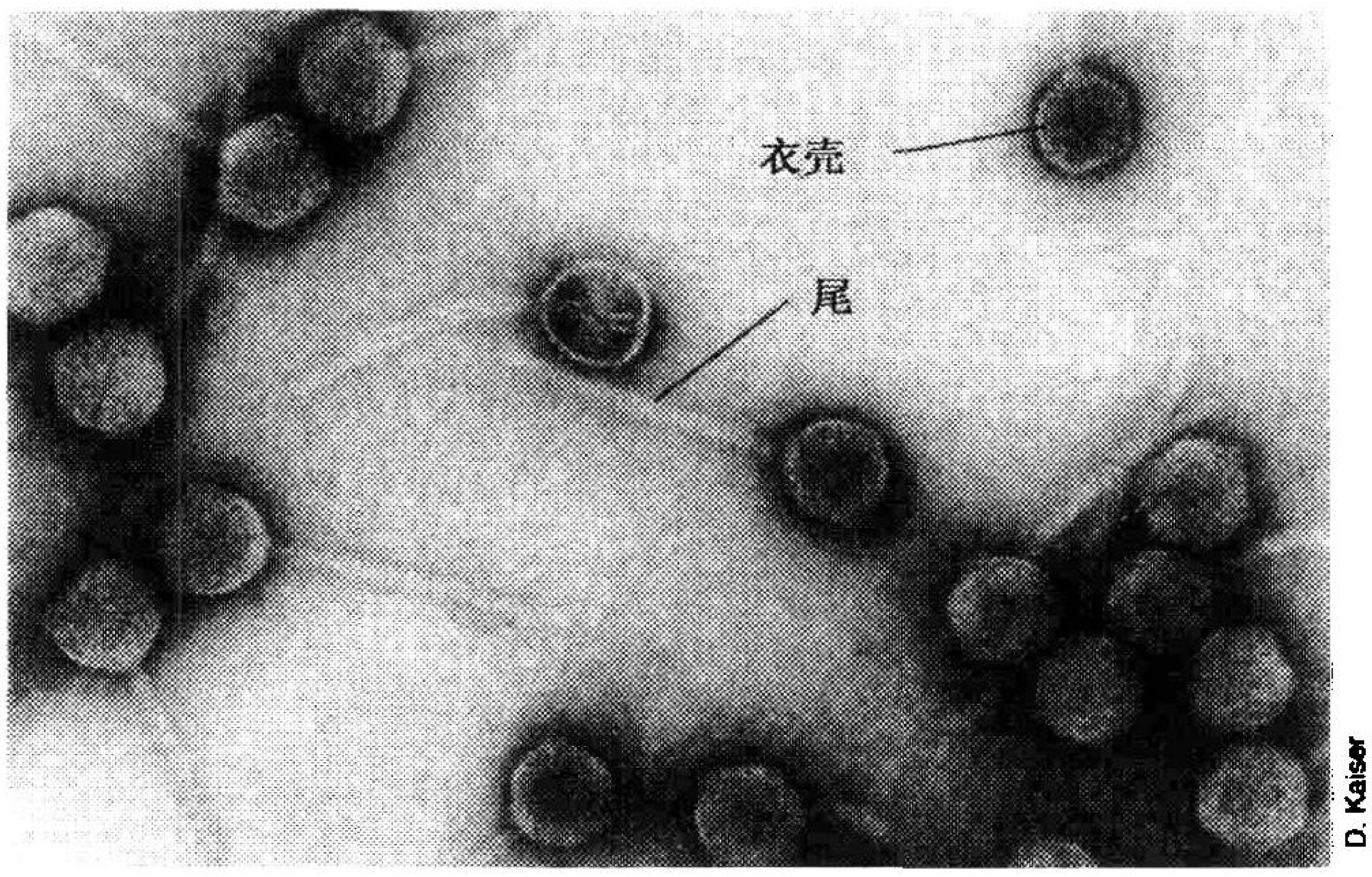
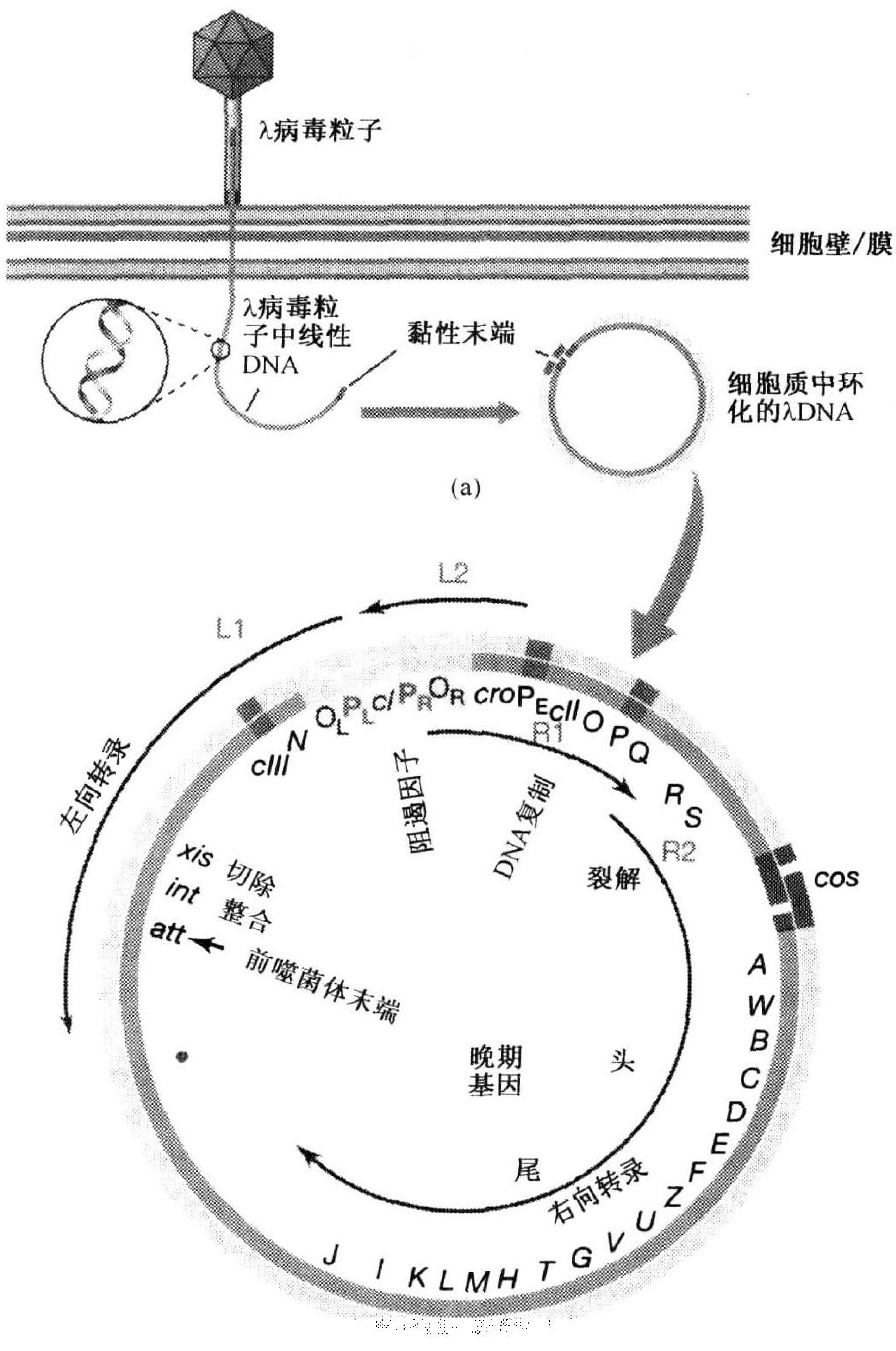


图 9.17　λ 噬菌体。 λ 噬菌体病毒颗粒的负染电子显微镜照片。每个颗粒的头部直径约为 65nm。



(b)

图 9.18 λ噬菌体基因组。(a) 感染后λ噬菌体基因组由线型转换为环状。(b) λ噬菌体的遗传和分子图谱。基因用字母表示；*att* 为噬菌体与宿主染色体的附着位点基因。有特殊意义的调节基因：*cI* 为阻遏蛋白基因；O_R，右操纵子；P_R，右启动子；O_L，左操纵子；P_L，左启动子；*cro*，次级阻遏基因；N，抗终止蛋白。λ的调节区域（以黄色表示）在环形图谱的上端。λ基因组的黏性末端连接起来时产生的位点叫做 *cos*（以红色表示）。λ的早期转录主要是从 P_L 开始向左方进行的（逆时针，L1）和从 P_R 开始向右方的（顺时针，R1）。3个受N蛋白影响的转录终止子在DNA上以蓝色盒表示。晚期右向转录物，编码头部和尾部蛋白以及有裂解功能的蛋白质，记为R2，转录起始于一个临近Q基因的启动子。记为L2的转录物是从 P_E 开始的正向调节转录物，编码阻遏蛋白。

λ的感染和裂解途径

λ噬菌体颗粒吸附于 *E. coli* 细胞壁上特异的蛋白质上（与麦芽糖的吸收有关的一种蛋白质）（见9.6节），然后注入DNA 。进入细胞的DNA立即环化（图9.18a），如果宿主不是λ的溶原菌，那么噬菌体基因组就开始表达，不论最终是导致裂解还是溶原，

其基因表达的第一步都是相同的。

宿主 RNA 聚合酶能识别少数噬菌体启动子并转录病毒的 RNA，其中 2 个启动子称为 P_L（promoter left）和 P_R（promoter right）（图 9.18b），它们位于在调节区域的两侧。它们所产生的转录物翻译后，产生 *N* 基因产物和 *cro* 基因产物。这 2 种基因产物都参与 λ 的调控。Cro 蛋白（*cro* 基因的产物）参与裂解和溶原途径的选择，我们将在后面讨论这个功能。N 蛋白是一种抗终止子蛋白质，能允许 RNA 聚合酶通过特异的终止子而继续转录（图 9.18b），使从 P_L 和 P_R 起始的转录物更长。这些长转录物可被翻译成多种蛋白质，包括 *c*Ⅱ、*c*Ⅲ 基因的产物。N 蛋白对 *Q* 基因前面的终止子不是非常有效，因此只产生少量的 Q 蛋白。

Q 蛋白也是一种抗终止蛋白。如果它的浓度足够高，就可以允许其附近的启动子合成 R2 转录物，如图 9.18。R2 被翻译成晚期蛋白，包括所有构成病毒粒子所需的结构蛋白和细胞裂解所需的蛋白质。在 Q 蛋白达到这一水平的同时，Cro 蛋白也达到足够的水平，通过与 O_L（operator left）和 O_R（operator right）结合来关闭 P_L 和 P_R 的转录。因此，Cro 是一种阻遏蛋白（见 8.5 节）。

Cro 蛋白在 O_R 位点的作用机制见图 9.19。注意这个操纵子中有 3 个相似但不相同的 Cro 结合位点。首先作用于位点 3，然后是位点 2，只有当这 2 个位点占满时，才作用于位点 1。只有与位点 1 结合才能真正关闭 P_R 的转录。只有当 P_L 和 P_R 都被关闭时，才没有 cⅡ 或 cⅢ 蛋白的合成。而这些蛋白质是进入溶原途径所需要的，因此当 Cro 大量合成时，λ 必然会进入裂解途径。

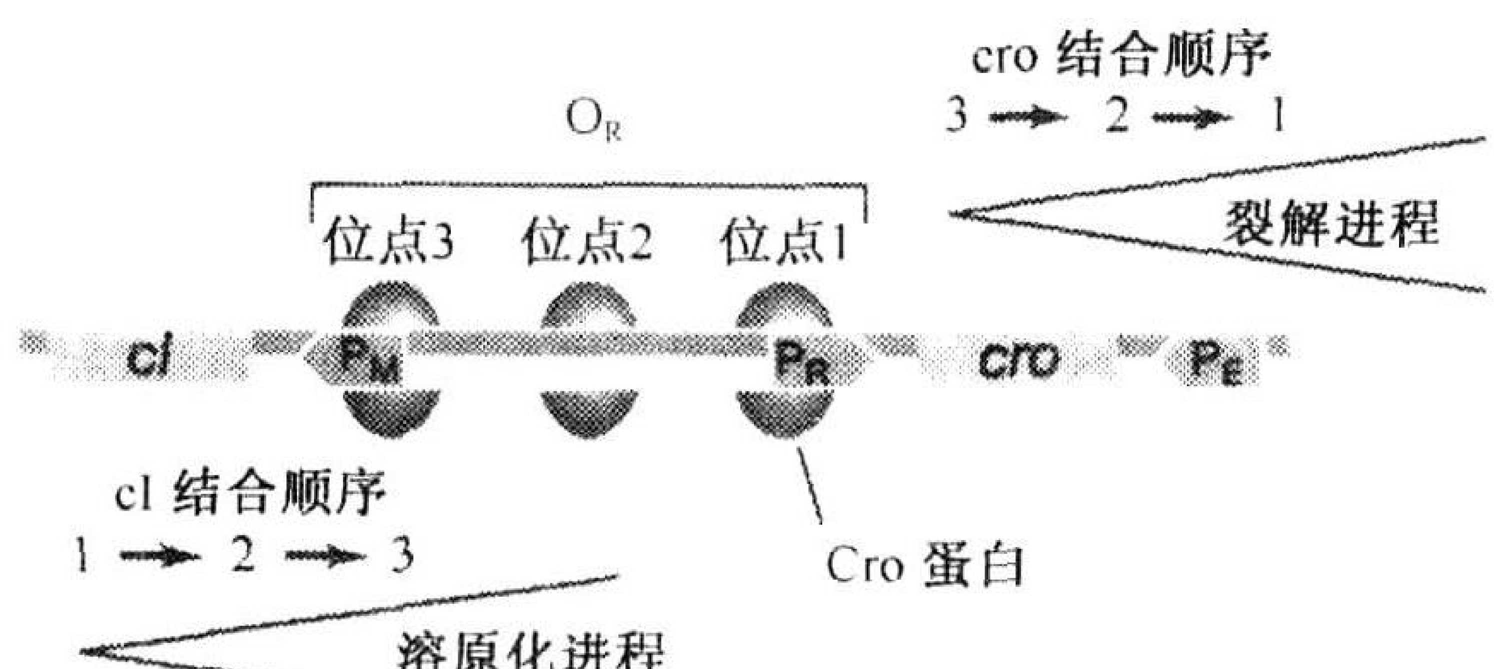


图 9.19　λ 噬菌体的右侧操纵子（O_R）。调节蛋白 Cro 和 λ 的抑制蛋白均结合 O_R 执行调节功能。Cro 蛋白按照先结合位点 3，再结合位点 2，而后是位点 1 的顺序结合到 3 个点上，先关闭 cⅠ 合成，而后关闭其自身的合成。λ 的抑制蛋白（cⅠ）以相反的顺序结合到这些位点上，先关闭 Cro 的合成，而后关闭其自身的合成。请比较此图与总结 λ 裂解/溶原步骤的图 9.21。

DNA 的滚环复制

P_L 和 P_R 启动子的关闭会引起 DNA 复制的变化。早期 DNA 的合成是从一个单一的起始位点开始的双向复制，且形成一种典型的类似 θ 形的中间体（见 7.6 节）。但是，当晚期蛋白被合成时，通过滚环复制（rolling circle replication）会形成长的线性多联体。这种机制和半保留复制不同，复制只朝一个方向进行，能产生非常长的 DNA 复制链（图 9.20）。滚环复制能使 DNA 快速复制，因此是一种能快速积累包装进成熟病毒粒子的 λ 基因组的有效机制。长的多联体被一种 DNA 切割酶切割成病毒大小的片段。

假如为 λ 噬菌体（不像 T4，见 9.9 节），切割酶在两条链的特殊位点（*cos* 位点）切割，距离为 12 个核苷酸，从而提供了环化过程中的黏性末端（图 9.18a）。然后这些线性 DNA 分子被包装进噬菌体头部，然后再添加上尾和其他蛋白质。最后细胞被噬菌体编码的酶裂解，这时 λ 的裂解周期就完成了。

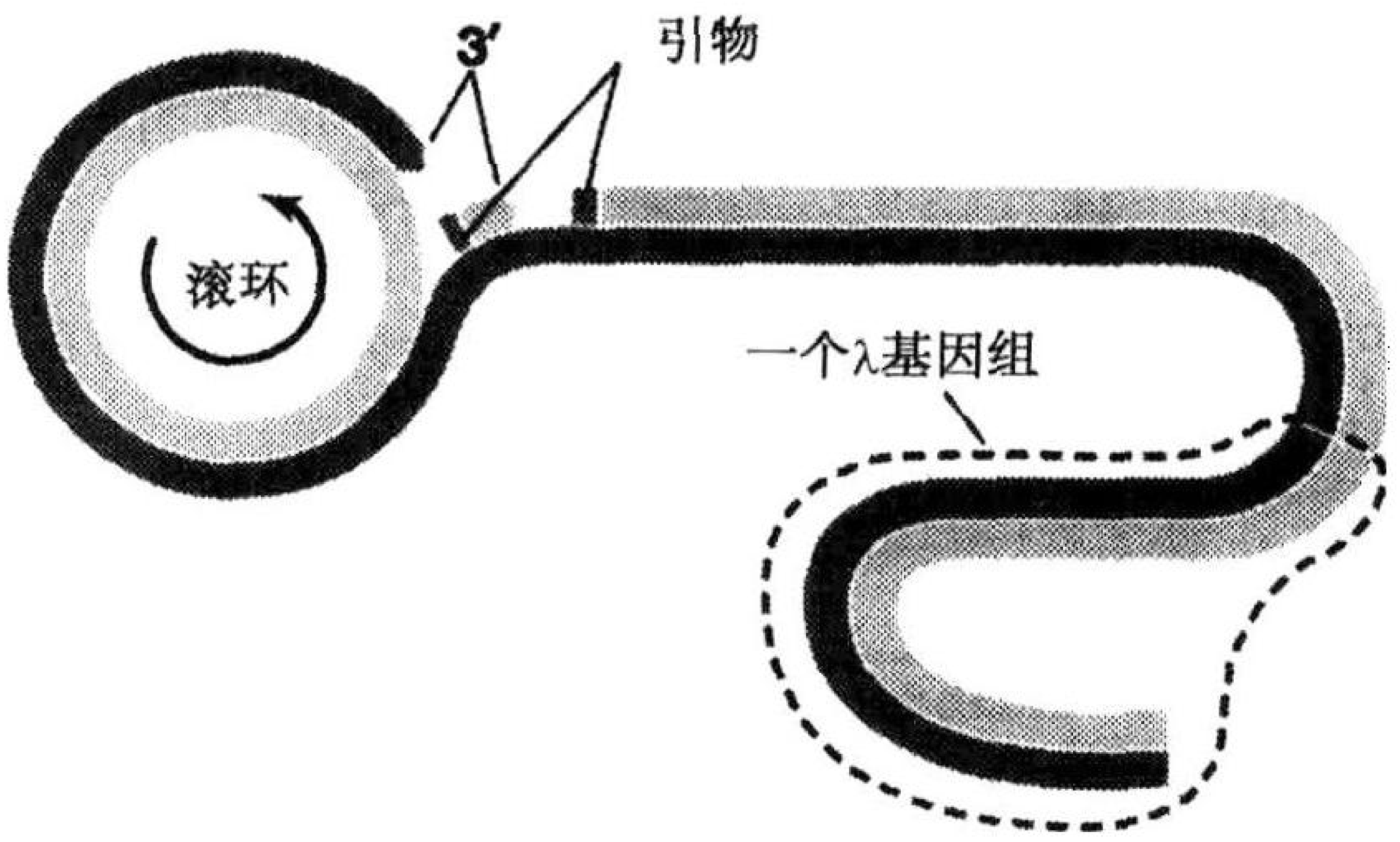


图 9.20　λ 基因组的滚环复制。当深绿色表示的链滚出后，对侧端的复制开始。请注意由于其中一条母链始终作为模板，而另一条只作一次模板，因而这种合成是不对称的。

裂解还是溶原：基因转换

是什么决定 λ 噬菌体要进入裂解途径还是溶原途径？λ 和其他温和性病毒存在一种基因转换来控制进入哪种途径。为了建立溶原，有两个必需条件：①所有晚期蛋白的产生必须被关闭；②一个拷贝的 λ 基因组被整合到宿主染色体中。

为了阻止晚期蛋白的合成，*cⅠ* 基因的产物必须合成，这种产物是 λ 的阻遏因子（λrepressor）（图 8.9b）。如果该蛋白质合成，它将阻遏所有其他 λ 编码的蛋白质的合成，然后溶原态将发生。*cⅠ* 产物对于建立溶原和保持溶原状态是必需的。*cⅠ* 基因位于 P_L 和 P_R 之间（图 9.18），不过这几个启动子都不能转录 *cⅠ* 基因。在感染过程中能够从 *cⅠ* 基因转录出 mRNA 的启动子叫做 P_E（promoter establishment），位于 *cro* 基因的偏右方，但是与 P_R 的方向相反，因此转录方向也与 P_R 启动的转录方向相反（图 9.18b 和 9.19）。但是，与其他启动子不同的是，P_E 必须被激活。一旦该启动子被激活，λ 阻遏因子就能被合成，并且进入溶原途径。

cⅡ 基因产物就是一种激活蛋白（见 8.6 节），能够激活 P_E 和另一种产生整合酶需要的启动子。尽管 cⅡ 蛋白在感染早期即被合成，但由于它会被 *E. coli* 中的蛋白酶降解，所以并不能稳定存在。如果 cⅡ 蛋白被降解掉，那么就不再有选择溶原途径的可能性。但是，当宿主蛋白酶不过量时，cⅡ 蛋白可通过噬菌体编码的 cⅢ 蛋白而保持稳定（或者当 cⅢ 蛋白过量表达时）。如果 cⅡ 蛋白是稳定的，那么它就能激活 P_E，从而产生 λ 阻遏蛋白（cⅠ）。λ 阻遏因子与 Cro 一样都能够和 O_L、O_R 结合，但是与操纵子中各位点结合的顺序与 Cro 蛋白相反（图 9.19），首先与位点 1 结合，关闭 P_R（关闭 P_L 的机制也是如此）。这时，所有其他 λ 蛋白质的合成都被终止。没有蛋白质 Q，晚期蛋白也就不能被表达，而 λ 也就不能进入裂解途径了。

但是如果没有 cⅡ 蛋白，P_E 就不能起作用，λ 阻遏因子也就不能形成。因此，如果要保持溶原状态，那么肯定还有其他途径来转录 *cⅠ* 基因。注意 λ 基因组中还有另外一

个启动子 P_M（promoter maintenance，图 9.19）。这个启动子在*cⅠ*基因上游（与 P_E 方向相同），当 λ 阻遏因子与位点 1 结合时 P_M 被激活，而所有 3 个位点均被阻遏因子结合时则被阻遏。因此当阻遏因子结合于位点 1 时，既是阻遏因子，也是激活因子，阻遏 P_R，激活 P_M。当 P_M 被激活，将产生更多的 λ 阻遏因子以维持溶原状态。

在图 9.21 中总结了当 λ 发生感染后是发生裂解还是进入溶原状态的步骤。简而言之，对裂解和溶原取向起决定作用的是 Cro 蛋白和 λ 阻遏蛋白（cⅠ）哪一个在这一调节过程占优势。如果是 Cro 蛋白那么将导致裂解，如果是 λ 阻遏蛋白将导致溶原态。

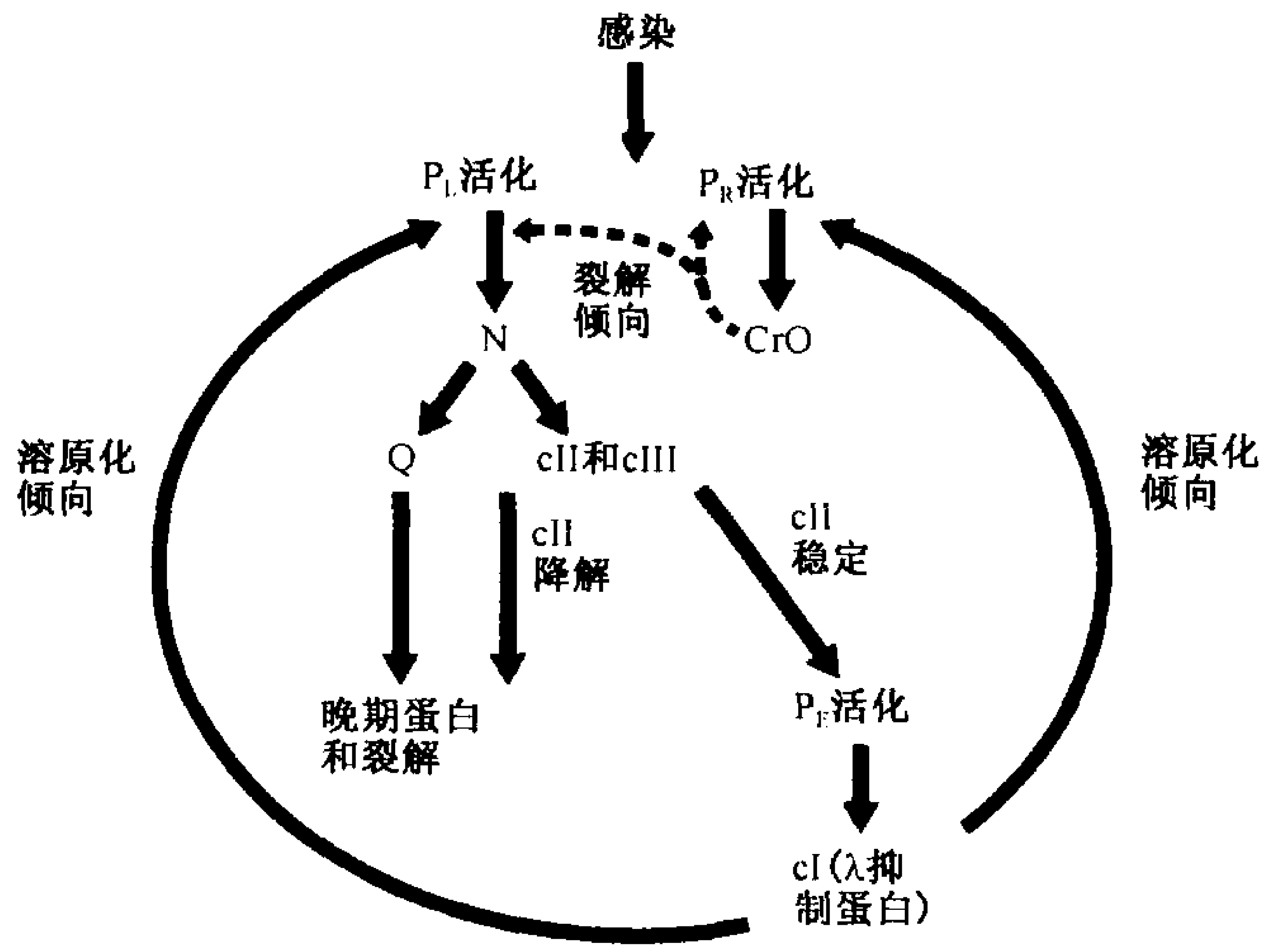


图 9.21　λ 感染过程总结。 λ 抑制蛋白（cⅠ）表达与否决定 λ 是裂解还是溶原生长。高 Cro 活性阻断表达足够量的 cⅡ/cⅢ，其结果是裂解生长。如果有足够的 cⅡ存在，将激活 cⅠ启动子，表达 cⅠ，导致溶原化。基因名称见正文。

整合

在 *E. coli* 基因组的某一特异位点 λDNA 整合到宿主染色体中，这是溶原过程所必需的。整合通过病毒 DNA 插入到宿主染色体中实现（病毒 DNA 的整合使宿主基因组被有效地延长了）。如图 9.22，感染后线性 λ 分子的黏性末端首先形成环状，这个环状 DNA 被整合到宿主细胞基因组上（当末端连在一起时这个位点称为 *cos*）。为了建立溶原，基因*cⅠ*（λ 阻遏因子）和 *int*（编码整合酶）必须表达。整合过程需要 λ 整合酶，这是一种位点特异性的核酸酶，催化噬菌体和细菌接合位点（*att* 位点）的重组。*int* 基因启动子类似于 P_E，受 cⅡ蛋白激活。

在细胞生长过程中，除了编码 λ 阻遏因子的*cⅠ*基因能表达外，λ 阻遏系统抑制整合 λ 基因的表达。宿主 DNA 复制时，整合的 λDNA 也同时复制，并传递到子代细胞。阻遏解除 λ 裂解途径开始，为了从染色体上切除出来，需要切除酶（*xis* 基因产物）和整合酶（*int* 基因产物）。

诱导后 λ 的裂解生长

损伤 DNA 的因子、紫外线、X 射线及化学损伤剂、氮芥子气等都能诱导 λ 溶原菌

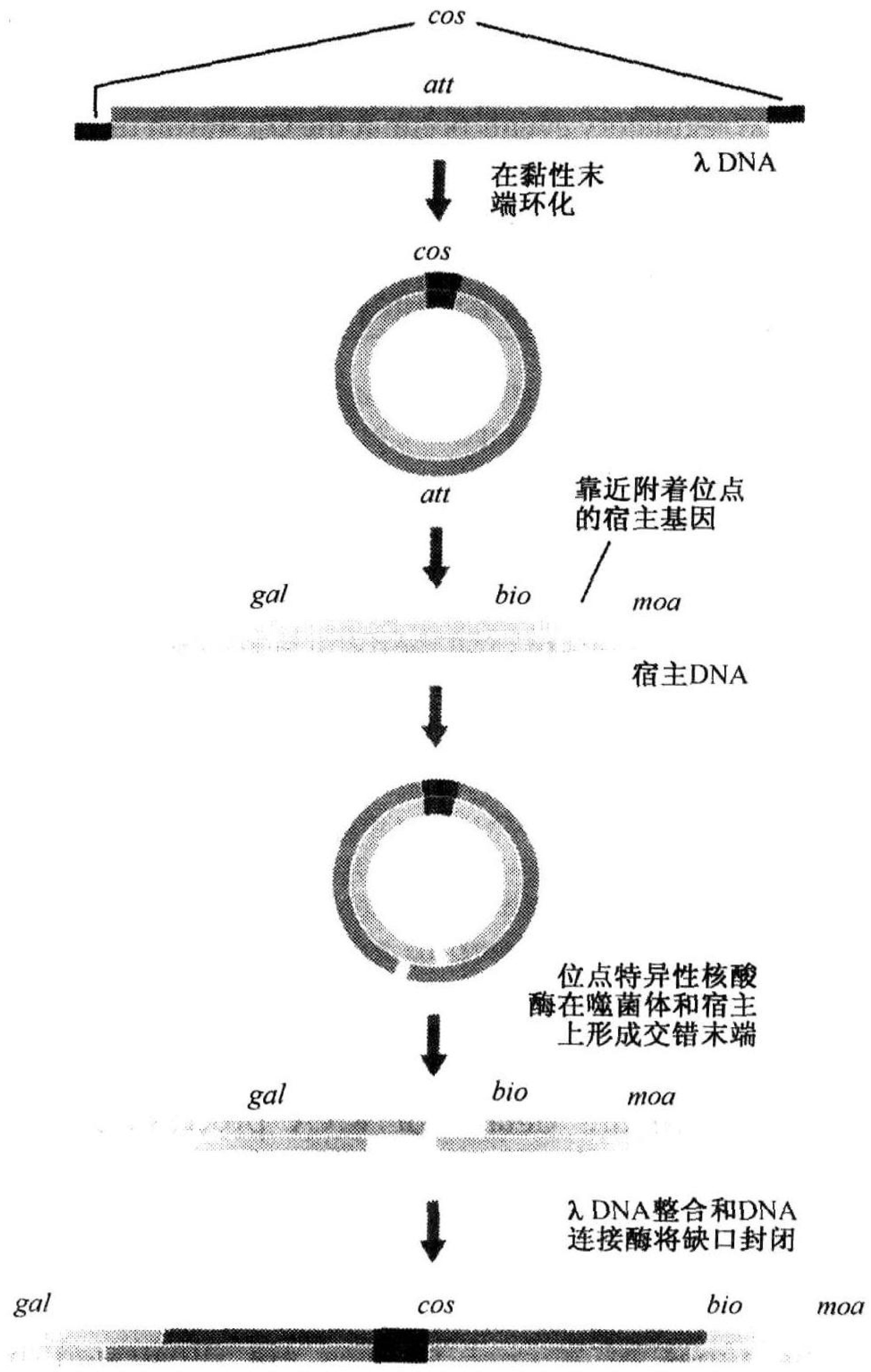


图 9.22 λDNA 整合入宿主。基因顺序细节见图 9.18b 所示遗传图谱。整合通常发生在宿主 DNA 上的特异位点，噬菌体上一个特异的附着位点（*att*）也参与。图中给出附着位点附近的一些宿主基因（半乳糖操纵子，消耗半乳糖；生物素操纵子，合成生物素；钼操纵子，合成钼辅助因子）。在一种位点特异性酶（整合酶）的参与下，互补末端的特异配对导致噬菌体 DNA 的整合。

进入裂解状态。当 DNA 受到损伤时，宿主一种称为 SOS 的防御反应会被激活（见 10.3 节）。大量的细菌基因开始启动，其中一些能帮助细菌存活下来。但是，SOS 反应的后果之一就是导致 RecA 蛋白（正常的功能是参与基因重组）转变成为一种特殊的蛋白酶（图 10.7），参与破坏 λ 阻遏因子。一旦这种 λ 阻遏因子失活，也就失去了控制作用，噬菌体特殊的转录过程开始。这会导致不可逆的裂解过程和细胞裂解，因为即使再生成 λ 阻遏因子，它仍会失活。因此对 λ 噬菌体的诱导是宿主染色体 DNA 被破坏的间接结果。

概念检查

λ是一种双链 DNA 温和性噬菌体。它的裂解和溶原化途径的调节要受到一些启动子和调节蛋白的控制。λ裂解途径受到 cⅠ蛋白（λ阻遏因子）抑制，受到 Cro 蛋白激活。尽管λ的基因组是线性的，但当进入细胞时将发生环化，DNA 将通过一种滚环复制方式合成。

◆ 如何才能使得λ成为原噬菌体?

◆ 在λ染色体的 O_R 位点发生了哪些调节过程?

9.12 动物病毒概述

在本章最开始的一些章节中我们讨论了所有病毒的一般特征，很少涉及动物病毒。这里我们将重点探讨动物病毒的一些性质，为讨论引起获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的反转录病毒打下基础。

从 9.5 节～9.7 节我们讨论了病毒的复制，其中涉及病毒的宿主。但是，值得重点指出的是噬菌体的宿主为原核细胞，而动物病毒的宿主为真核细胞。我们将会在第 16 章重点强调它们的不同，以及详细介绍一些种类的动物病毒。但是，我们还是要先指出几点：①不像在原核生物中，动物病毒完整的病毒粒子都要进入到动物细胞中去；②真核细胞具有细胞核，大多数病毒要在这里复制；另外，动物细胞中具有精细的 RNA 处理过程（见 14.8 节），这将影响到动物病毒的复制。但在此我们不多赘述。

动物病毒的分类

图 9.23 说明动物病毒的不同类型。在 9.1 节、9.2 节和 9.7 节中我们讨论了病毒分类

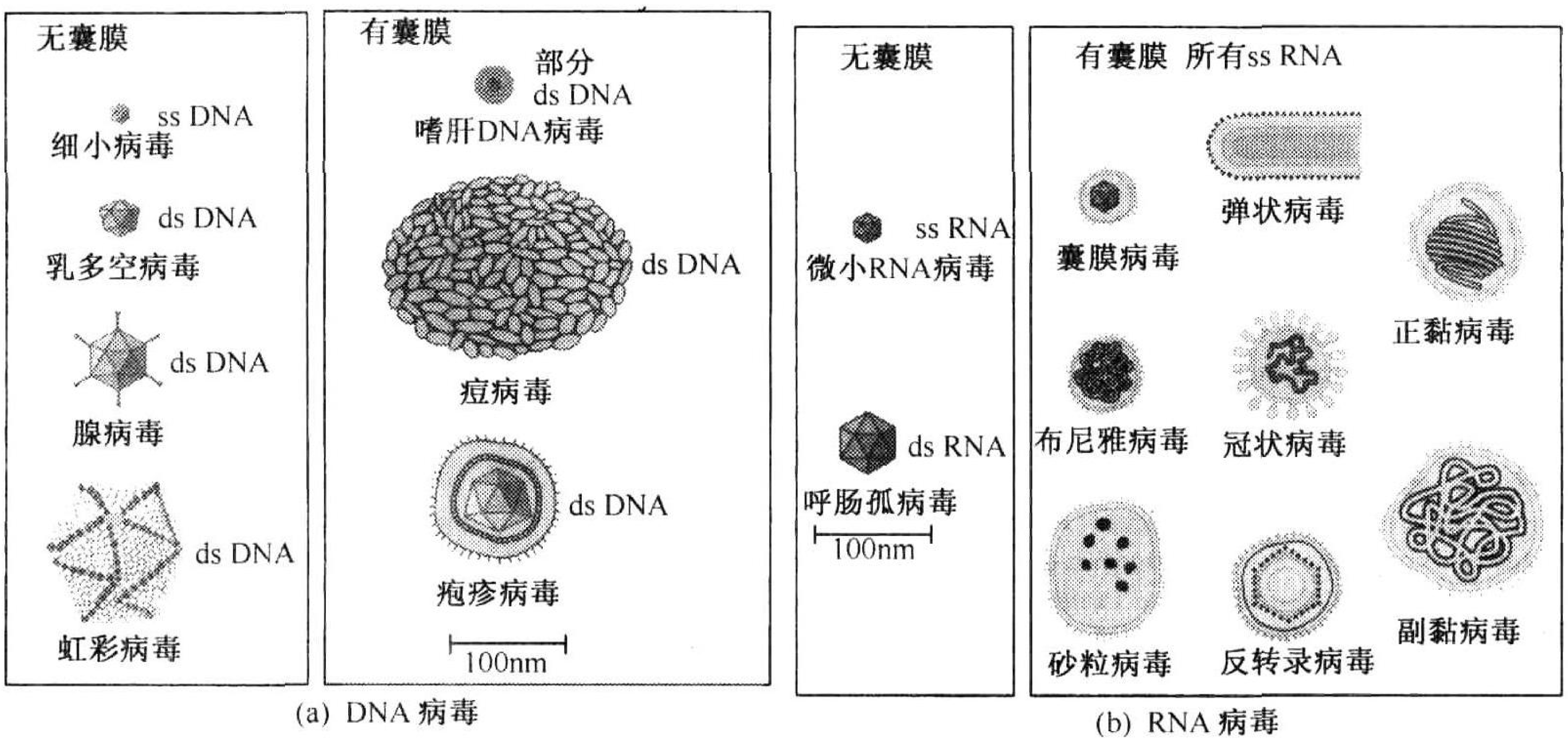


图 9.23 动物病毒多样性。主要的脊椎动物病毒的形态和相对大小。嗜肝病毒基因组有一条完整的 DNA 链和部分互补链（见 16.15）。

的基本原理。请注意与有囊膜的细菌病毒相比，有囊膜的动物病毒种类要多很多（见 9.7 节）。这可能与宿主细胞外部结构的不同相关。与原核细胞不同，动物细胞缺少细胞壁，因此病毒更容易从细胞中分泌出来。它们穿过膜时，会带走细胞部分脂质双分子层。

大多数已被详细研究的动物病毒是那些比较容易进行细胞培养的病毒。动物病毒采用与细菌病毒相同的分类系统，即 Baltimore 分类系统（表 9.2），依据基因组类型和复制方式进行分类。已知动物病毒能以多种复制方式进行复制，这些将在第 16 章中讨论。

病毒感染动物细胞的后果

病毒对细胞有多种可能的影响。裂解导致宿主细胞被破坏（图 9.24）。不过，也有另一种结果：部分有囊膜的病毒通过出芽方式释放毒粒，比较缓慢，不引起宿主细胞的裂解，细胞仍能存活，并且在长时间内连续地产生病毒。这种感染称为持续性感染（persistent infection）（图 9.24）。

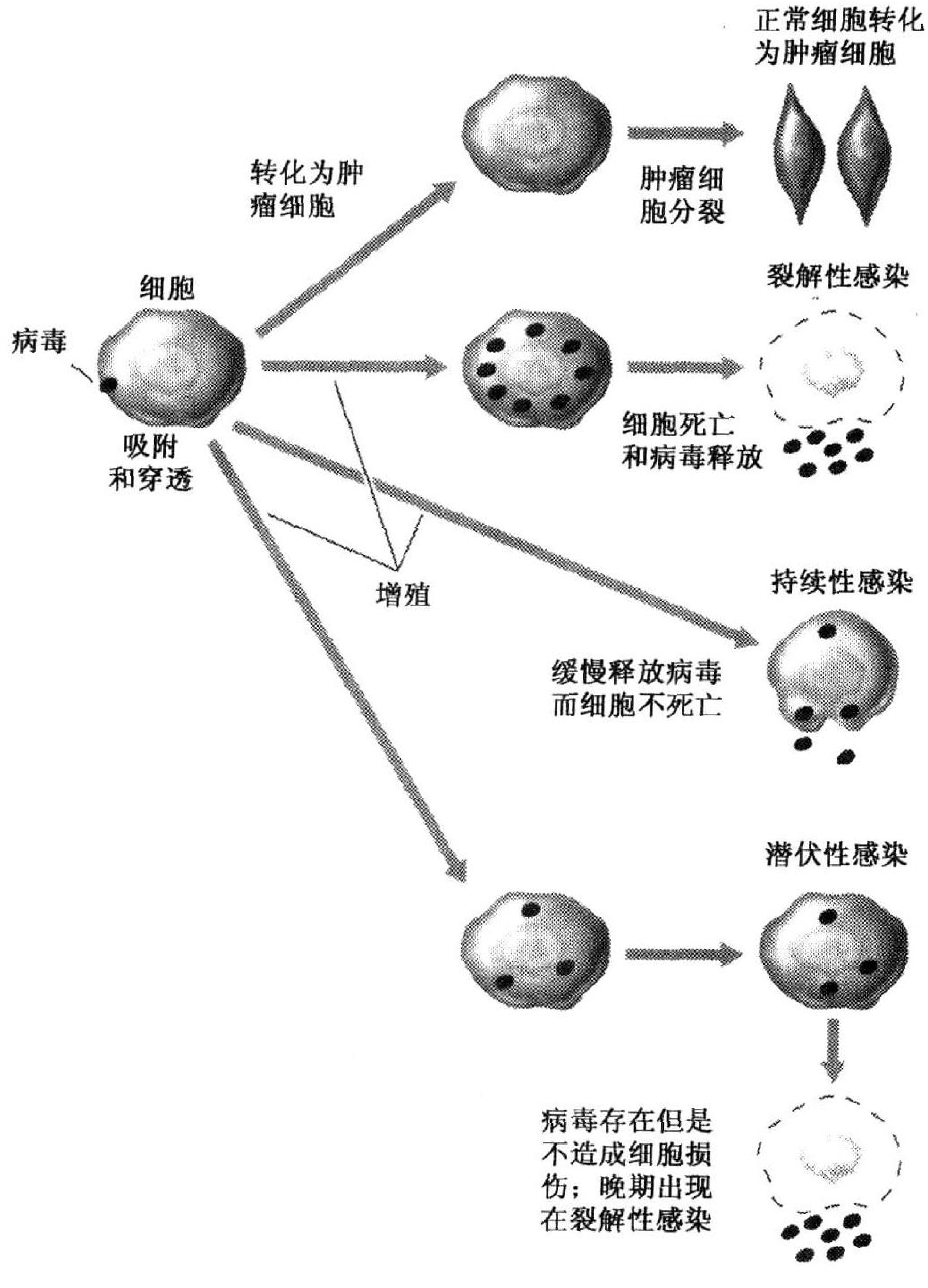


图 9.24 动物病毒感染细胞时可能产生的效应。请注意大多数病毒是裂解性的，并且只有极少数会引起肿瘤。许多致瘤病毒属于疱疹病毒类（见 16.12 节）。

病毒还能引起潜伏性感染（latent infection）。在潜伏性感染中，病毒感染和症状出现之间有一个潜伏期。由单纯疱疹病毒（herpes simplex virus）引起的唇疱疹（fever

blister）（见 16.12 节）就是一个典型的病毒潜伏性感染的例子。当病毒脱离潜伏状态开始复制时，会偶尔表现出零星的症状（细胞裂解的后果）。在动物细胞中病毒感染的潜伏期通常不像温和性噬菌体那样，由病毒基因组整合到细胞基因组中引起。

最后，某些动物病毒能使正常细胞转化为肿瘤细胞，这个过程称为转化（transformation）（图 9.24）。我们将在 16.12 节中讨论致瘤病毒。

已知有许多不同种类的病毒，但是在所有图 9.23 列出的病毒中，其中一种代表着一类非常独特的复制模式，这就是反转录病毒。这里我们将它们作为既复杂又极特殊、具有重要医学应用价值的动物病毒代表进行介绍。

概念检查

动物病毒涵盖了所有已知的基因组复制模式。许多动物病毒具有囊膜，在离开细胞时带走宿主细胞质膜的一部分。不是所有被感染的宿主细胞都将导致裂解或死亡，潜伏或持续性感染也是很普遍的，还有一些动物病毒能导致癌症。

- *病毒的潜伏和持续性感染有什么区别？*
- *比较动物病毒和细菌病毒进入细胞的机制。*

9.13 反转录病毒

反转录病毒（retrovirus）具有 RNA 基因组，它的复制必须通过 DNA 中间体完成（见 9.1 节和图 9.11）。“*retro*”一词含义是“反向”，这类病毒的命名源于这些病毒的信息以相反的方向从 RNA 到 DNA 传递（见 7.1 节）。反转录病毒借助于反转录酶实现这一过程。然而，反转录酶的作用并不局限于反转录病毒。乙型肝炎病毒（一种人类病毒）和花椰菜花叶病毒（一种植物病毒）在它们的复制过程中也会用到反转录酶（见 16.15 节）。与反转录病毒不同，这些病毒基因组是 DNA 而不是 RNA。

我们关注反转录病毒还有其他一些原因。如它们是最早发现的致癌病毒，其致癌特性已被广泛研究。同时，另一种反转录病毒，人类免疫缺陷性病毒（human immunodeficiency virus，HIV）能导致获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS)。这种病毒能感染在人类免疫系统中发挥重要作用的 T 淋巴细胞（T 辅助细胞）。在后面的章节中我们会讨论到 AIDS 的医学和免疫学特征（见 25.6 节和 26.14 节）。

反转录病毒属有囊膜病毒（图 9.25a），病毒囊膜内包裹着很多蛋白质，一般分为 7 种，4 种结构蛋白和 3 种酶。反转录病毒颗粒内的酶包括反转录酶、整合酶及蛋白酶。病毒颗粒中的特异性细胞 tRNA 分子参与病毒复制。

反转录病毒的基因组和复制特点

反转录病毒基因组很特殊，由 2 个独立、具有正向互补序列的单链 RNA 分子组成。典型的反转录病毒的基因组遗传图谱如图 9.25b 所示。尽管不同反转录病毒间可能有些差异，但是所有的反转录病毒都包括以下基因，且顺序相同：*gag*，编码内部结构

蛋白；*pol*，编码反转录酶和整合酶；*env*，编码外膜蛋白。有些病毒，如劳斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus）在 *env* 下游还有第 4 个基因参与细胞转化和癌变。图示中的末端重复序列在复制过程中起着重要作用（后面详述）。

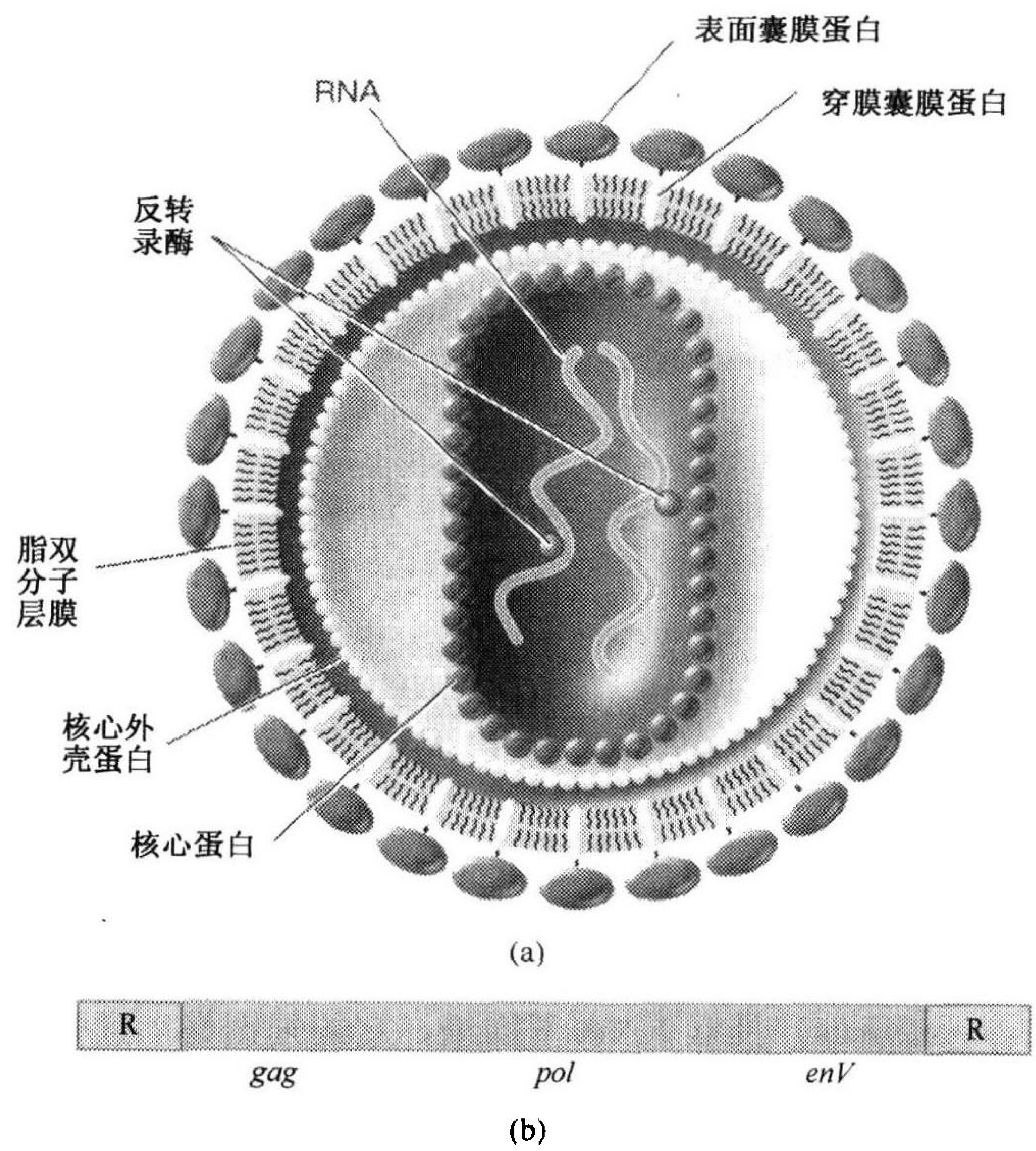


图 9.25　反转录病毒的结构与功能。(a) 反转录病毒的结构。(b) 典型的反转录病毒基因组的基因图谱。基因组 RNA 的每个末端都含有正向重复序列（R）。细节见正文。

反转录病毒的整个复制过程可以概括为以下几个步骤（图 9.26）：

（1）在细胞膜的特殊受体处通过与胞膜融合进入细胞。

（2）在细胞膜上病毒粒子脱去衣壳，基因组和酶类留在核心。

（3）反转录。在反转录酶的作用下 2 条 RNA 基因组中的一条转变为单链 DNA，然后形成线性双链 DNA，进入细胞核。

（4）整合，反转录的 DNA 拷贝整合到宿主基因组中。

（5）转录，反转录的 DNA 转录形成病毒 mRNA 和子代病毒 RNA。

（6）装配和壳体形成。在细胞质中将基因组 RNA 装配进核衣壳中。

（7）出芽，病毒粒子在细胞质膜处以出芽方式释放出去。

反转录酶的活性

RNA 基因组进入细胞后首先进行反转录：利用病毒粒子中携带的反转录酶将 RNA 转变为一个 DNA 拷贝，这一过程发生在细胞质中，脱壳的病毒核心内，合成的 DNA 为双链线性分子，这个过程的详细内容见 16.15 节。反转录酶是一种 DNA 聚合酶，像所有的 DNA 聚合酶一样，反转录酶也需要引物（见 7.5 节）。这种引物是特异的细胞

内转运 RNA（tRNA）。用作引物的 tRNA，由病毒在前一个宿主细胞中包装时带入病毒粒子。

整个反向转录的过程会产生一种具有长末端重复序列（LTR，图 9.26）的产物，这种长末端重复序列比基因组本身的重复序列（图 9.25）要长。全部的双链 DNA 分子和整合酶蛋白一并进入细胞核，之后病毒 DNA 整合进宿主 DNA。这些 LTR 含有强转录启动子而且参与整合过程。病毒 DNA 整合到宿主基因组中的过程与噬菌体 DNA 整合到细菌基因组形成溶原态的过程类似（见 9.10 节）。整合可以发生在细胞 DNA 上的任何位置，一旦整合发生，形成的原病毒（provirus）就成为稳定的遗传因子。原病毒的遗传信息可以表达，也可以以潜伏状态存在而不表达。

如果右端 LTR 上的启动子被激活，整合的原病毒 DNA 就在细胞 RNA 聚合酶的作用下开始转录，这些转录物或被包装进新的病毒粒子（作为基因组），或被翻译成病毒的蛋白质。一些病毒蛋白首先翻译成大的 gag 蛋白前体，然后在蛋白酶的作用下被剪切为衣壳蛋白（图 16.26）。偶然地，由于通读（可能是由于在终止密码子处插入了一个氨基酸也可能是因为核糖体可读框移码）会引起反转录酶基因 *pol* 的表达。这样合成反转录酶，可以被包装进病毒粒子。

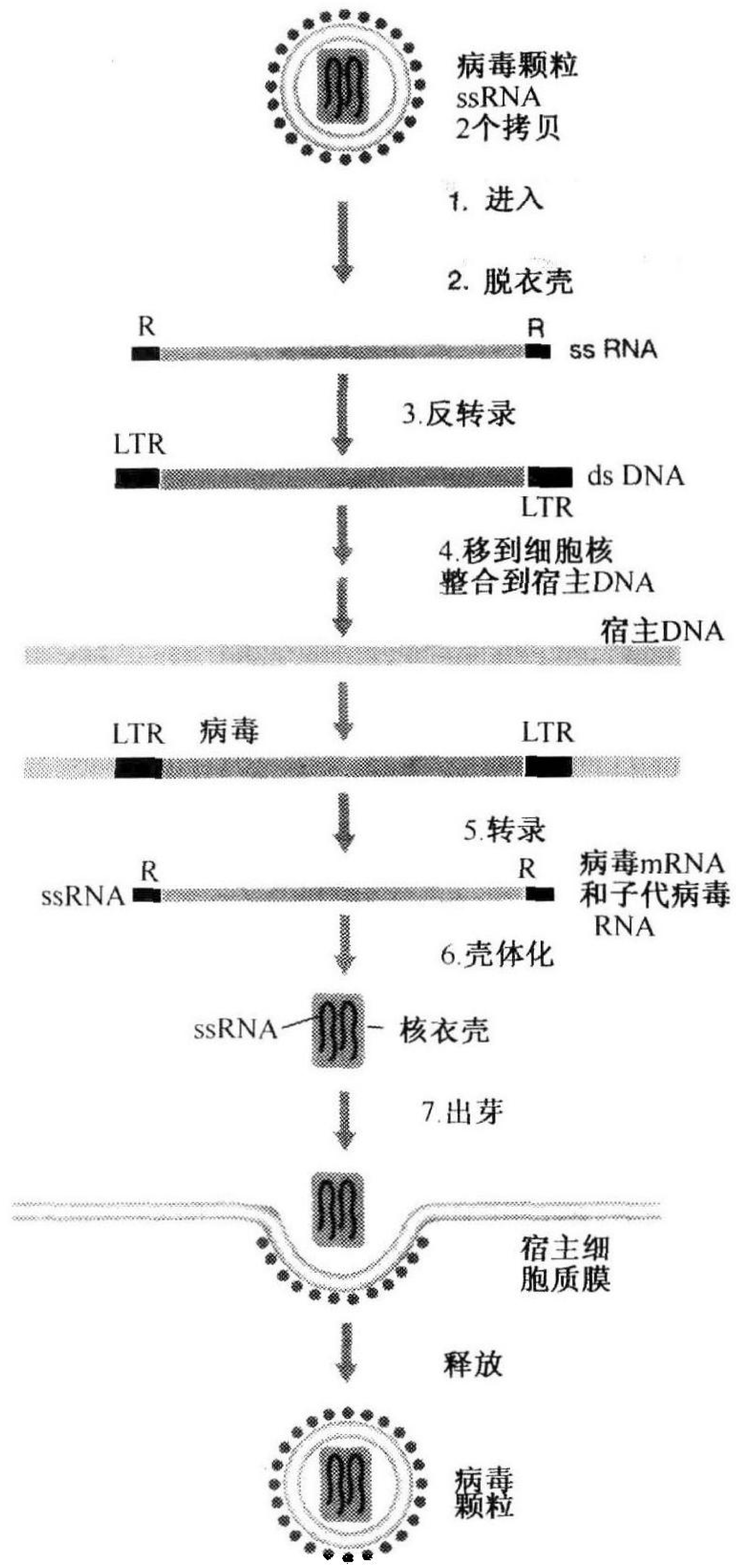


图 9.26　反转录病毒的复制过程。 R，正向重复序列；LTR，长末端重复序列；信息由 RNA 向 DNA 传递的细节参见图 16.25。

当病毒蛋白质积累到足够量时，核衣壳装配开始，RNA 基因组壳体化后成为成熟的核衣壳，移动到细胞质膜，最后形成有囊膜的病毒粒子。当核衣壳以出芽的方式穿过细胞膜时，病毒将完全被封闭，然后释放出去以感染邻近的细胞（图 9.26）。

概念检查

反转录病毒是一类通过 DNA 中间体进行复制的 RNA 病毒。一种称为人类免疫缺陷病毒的反转录病毒能导致 AIDS。反转录病毒粒子中带有反转录酶，能够将遗传信息从 RNA 复制到 DNA。DNA 整合到宿主染色体中，像温和性病毒那样。DNA 能被转

录产生 mRNA（和新的基因组 RNA）或者以潜伏状态保留在细胞中。

◆ 为什么这些病毒称为反转录病毒?

◆ 温和性噬菌体和反转录病毒的生活周期有何不同?

V 亚病毒颗粒

至此，我们对病毒多样性（在第 16 章进一步补充）的简介还不能涵盖所有病毒的复制以及特性的知识，在这一章我们还将介绍两类类似病毒的感染因子：类病毒和朊病毒。这些都是亚病毒颗粒。

9.14 类病毒和朊病毒

我们对病毒的定义是：能利用正常细胞功能进行自身复制的遗传因子，并且要有一种具有感染性的、成熟的细胞外形式。还有一些具有感染性类似病毒的病原体，但是其性质与这个定义略有不同，其中 2 种最重要的就是类病毒和朊病毒。我们将在这里讨论。

类病毒

类病毒（viroid）是小的环状单链 RNA 分子，是迄今所知道的最小的病原体。类病毒的大小范围为 246～399 核苷酸，并且具有一定程度的序列同源性，表明了它们可能具有共同的进化根源。类病毒能导致许多重要的植物病害，因此有可能严重影响农业发展。一些研究得较为清楚的类病毒包括可可树类病毒（coconut cadang-cadang viroid，246 核苷酸）、柑橘裂皮类病毒（citrus exocortis viroid；375 核苷酸）和马铃薯纺锤块茎病类病毒（potato spindle tuber viroid；359 核苷酸，图 9.27）。

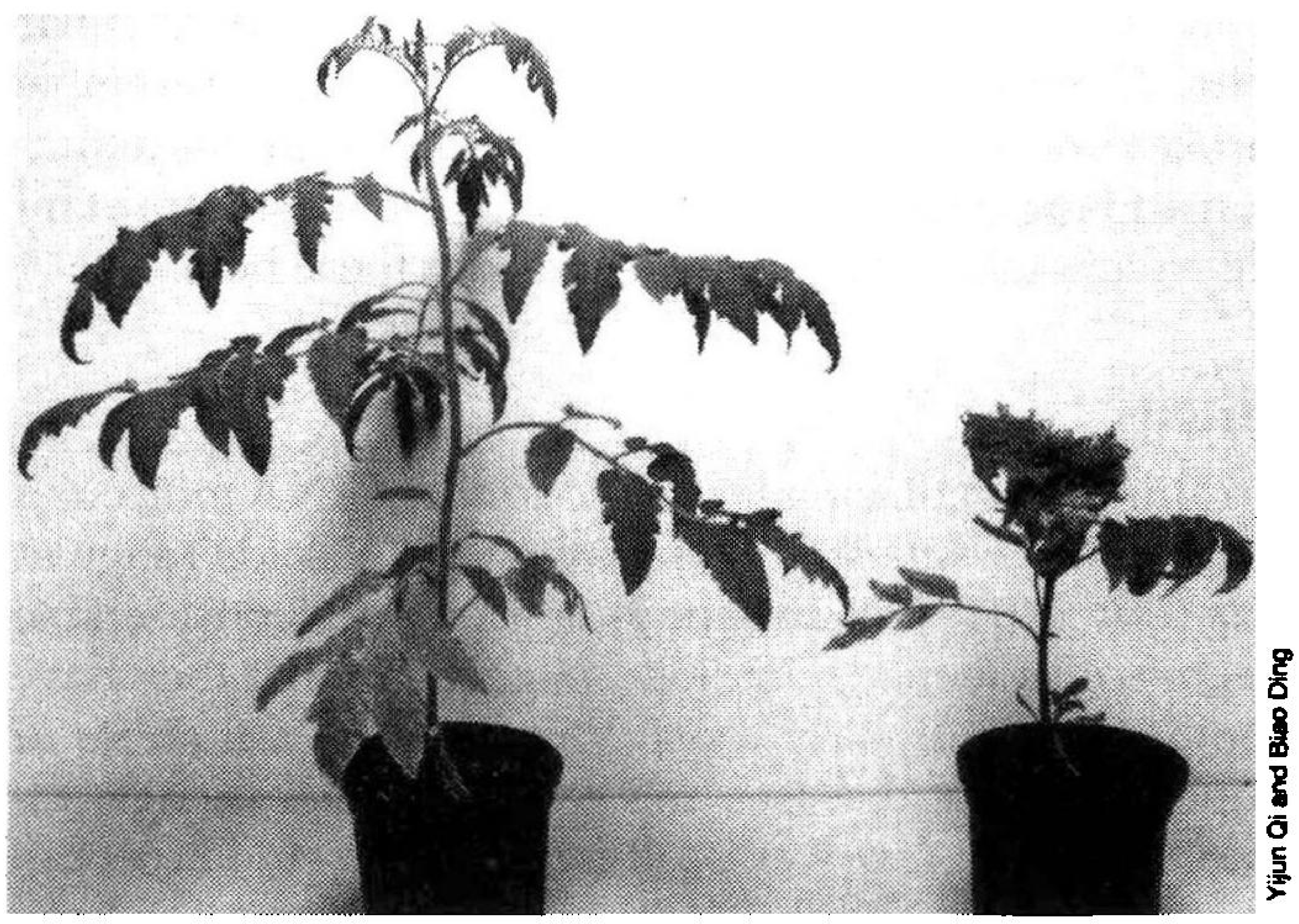


图 9.27　类病毒。健康番茄（左）和感染马铃薯纺锤块茎病类病毒（PSTV）番茄（右）植株照片。许多类病毒的宿主范围十分严格。然而，PSTV 既能感染马铃薯也能感染番茄，导致生长缓慢、平顶和未成熟植株死亡（右）。

类病毒的细胞外形式是裸露的 RNA，没有蛋白质衣壳。甚至更有趣的是，这些 RNA 分子不含编码蛋白质的基因，因而类病毒的复制完全依赖于宿主的功能。类病毒的单链环状 RNA 分子在闭合末端附近会形成双链二级结构（图 9.28）。类病毒分子通过昆虫或其他机械伤害造成的伤口进入植物。类病毒借助于一种植物的 RNA 聚合酶在宿主细胞核内复制。

类病毒感染的植物或者不产生症状，或者产生从轻微到致命的不同症状，这取决于类病毒的种类（图 9.27）。大多数严重的症状都与生长相关，表明类病毒是一种“调节 RNA”（见 8.14 节），这样的例子在植物和动物中都是很普遍的。因此，类病毒可能是一种调节 RNA，它从细胞中发挥组成性作用进化到在细胞中发挥破坏作用。还没有在动物中发现类病毒疾病，并且关于类病毒导致植物致病的详细机制还不清楚。



图 9.28 类病毒。类病毒的结构，示单链环状 RNA 是怎样通过链内的碱基配对形成一种类似双链的结构。

朊病毒

朊病毒（prion）代表着与类病毒相对的另一个极端。它们有着不同的细胞外形式，但所有细胞外形式都是蛋白质，不含有任何核酸成分。但是，朊病毒蛋白质颗粒具有感染性，不同的朊病毒引起动物多种疾病，如羊搔痒症，牛海绵状脑组织疾病（bovine spongiform encephalopathy，BSE，又叫疯牛病），鹿和麋鹿中的慢性消耗症以及人库鲁氏病和克罗伊茨费尔特——雅各布综合征（Creutzfeldt-Jakob disease，CJD）。迄今还没有发现植物的朊病毒性疾病。总结起来，朊病毒疾病是一种传染性的海绵状脑病（transmissible spongiform encephalopathie，TSE）。1997 年美国科学家 Stanley B. Pruisner 因为在朊病毒疾病以及朊病毒蛋白质方面的开创性工作获得了诺贝尔奖。

直至 1996 年，通过在英国的疾病追踪，发现这种病毒引发的疯牛病（BSE），也可以感染人，引起一种变异的 CJD，称为新型 CJD（nvCJD），这种病毒才被我们熟知。传染来自污染的牛肉制品，几年以后 nvCJD 成为世界范围内动物饲料加工厂健康安全的主要威胁（见 29.11 节）。

许多发生在英国或其他欧洲联盟国家（EU）的 BSE 的例子都和不当饲养有关，人们在饲料中添加了回收的牛或羊骨粉作为蛋白质补充剂，然后给未感染的动物喂食。直到 1994 年这种方法在所有的 EU 国家中被禁止，从那以后 BSE 的例子才显著下降。迄今为止，未发现通过其他饲养的动物如猪、鸡或鱼传染 TSE。

虽然关于朊病毒如何致病还没有统一定论，但最可能的机制是（图 9.29）：朊病毒感染后导致更多拷贝的朊病毒蛋白质的产生，进一步产生疾病症状。症状都是神经性的，大多数情况下都是由朊病毒蛋白聚集体的堆积破坏了脑组织或相关的神经组织导致（见 29.10 节和图 29.10）。但是如果朊病毒缺少核酸，这些蛋白质又是如何编码的呢？

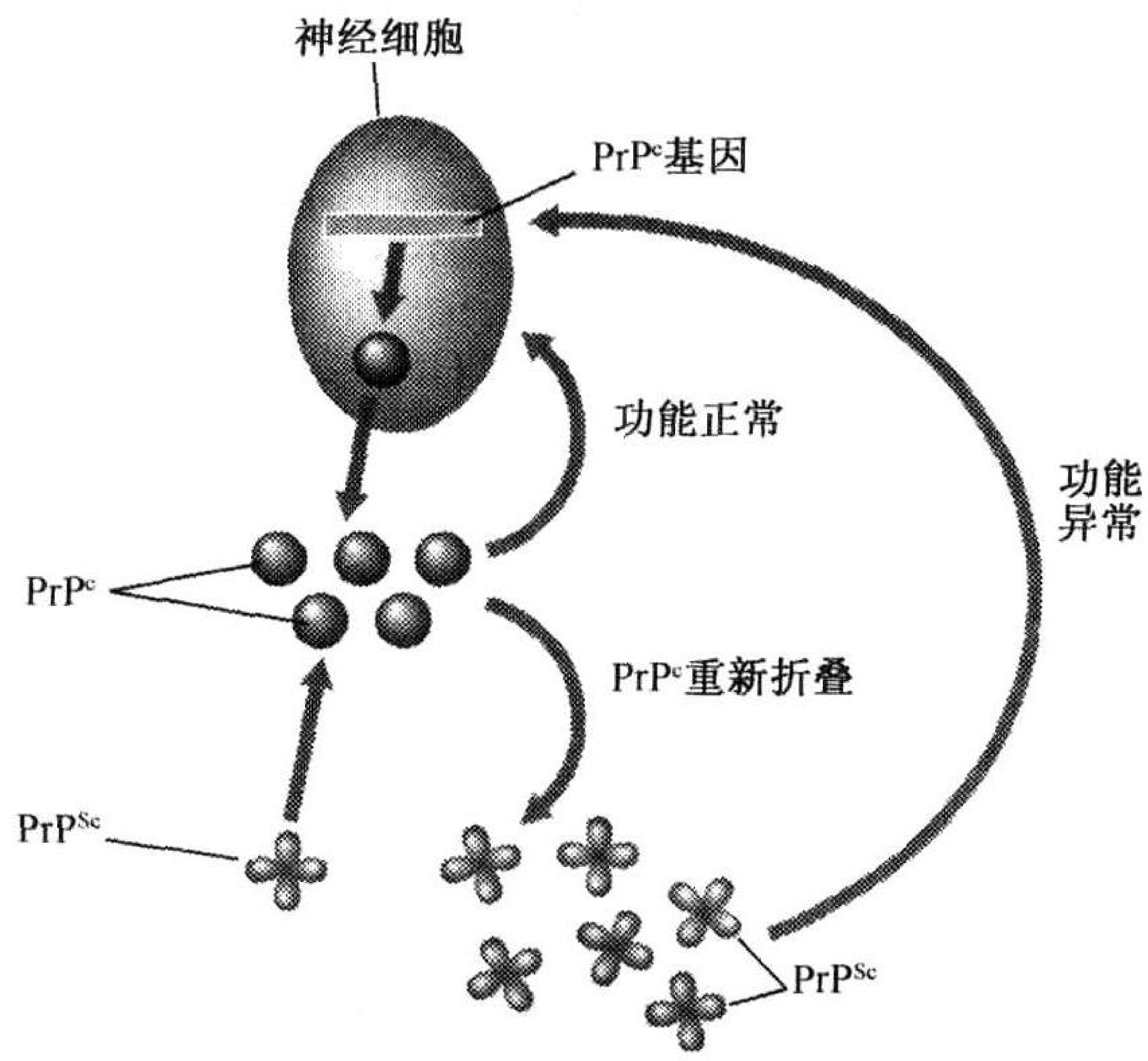


图 9.29 朊病毒的作用机制。神经细胞产生具有正常功能的朊病毒蛋白（PrP^c），错误折叠的朊病毒蛋白（PrP^{Sc}）能催化 PrP^c 重折叠成 PrP^{Sc}，PrP^{Sc}形式的蛋白质耐受蛋白酶、不可溶，在神经细胞中会聚集。这最终将破坏神经组织和神经细胞。

宿主细胞中含有一种基因能编码一种糖蛋白为 PrP^c，这种蛋白质几乎和朊病毒蛋白一样。PrP^c 在健康动物中产生并且大部分存在于神经组织。侵入的朊病毒，称为 PrP^{Sc}，它是 PrP^c 蛋白结构上发生修饰的形式，并且它本身能够修饰 PrP^c，从而使之转化为 PrP^{Sc}。修饰涉及折叠类型的选择。导致蛋白质失去它正常的功能，部分耐受蛋白酶，在神经细胞中变得不可溶并开始聚集（图 9.29）。在这种状态下，朊病毒蛋白开始堆积（图 29.10），并且开始出现神经病方面的症状。因此，朊病毒并不是简单地破坏宿主细胞的酶类而是将细胞内的正常蛋白转换成能自行传播的结构状态。

类病毒和朊病毒不仅使病毒的定义扩大，它们的复制方式和利用宿主的机制都很独特。但是，朊病毒在我们介绍过的所有的遗传因子中是最为特殊的，因为这种感染性因子缺少核酸。

概念检查

类病毒是环状单链 RNA 分子，不编码蛋白质，完全依赖于宿主编码的酶系统进行复制。相反，朊病毒具有蛋白质却不具有核酸。总而言之，类病毒和朊病毒是已知的最小的致病原。

◆ 如果类病毒为环状分子，为什么要像图 9.27 那样画？

◆ 朊病毒是如何致病的？

复习题

1. 病毒基因组与细胞基因组有何区别？（见 9.1 节）
2. 为病毒下定义。根据你的定义，说明其中哪些是必要条件？（见 9.2 节）

3. 从病毒的角度为宿主下定义。(见 9.3 节)
4. 描述单个噬菌体使琼脂平板上菌苔形成噬菌斑的过程。(见 9.4 节)
5. 某些条件下可以获得不含核酸的病毒衣壳蛋白。电镜观察这些衣壳蛋白与病毒颗粒很相似。从这个现象分析病毒核酸在包装过程中的作用。这样的颗粒有感染性吗?为什么?(见 9.5 节)
6. 解释限制性内切核酸酶如何抑制噬菌体感染。为什么通用 DNA 核酸酶没有这种功能?(见 9.5 节)
7. 病毒复制过程可分为 5 个步骤。请描述每一步骤的相关过程。(见 9.6 节和 9.7 节)
8. 为什么正链 RNA 病毒无论生活周期还是病毒颗粒，都比负链 RNA 病毒简单?(见 9.8 节)
9. T4 噬菌体基因组结构与大肠杆菌有何异同?(见 9.9 节)
10. 为何将病毒基因划分为早期基因和晚期基因?早期基因和晚期基因通常编码何种蛋白质?以 T4 噬菌体和 λ 噬菌体为例，说明晚期基因是如何调控的。(见 9.9 节)
11. 解释烈性、溶原和原病毒 3 个概念。(见 9.10 节)
12. 有一株大肠杆菌，由于介导吸收麦芽糖的外膜蛋白丢失，对 λ 噬菌体感染有抗性;如果该株大肠杆菌是 λ 溶原菌，则对 λ 噬菌体感染免疫。试说明抵抗与免疫的区别，分别解释这两种情况。(见 9.10 节和 9.11 节)
13. 描述动物病毒感染对动物产生的影响。(见 9.12 节)
14. 一般地，tRNA 仅用于翻译;但是 tRNA 在反转录病毒核酸复制中起作用。试对该作用加以说明。(见 9.13 节)
15. 列举病毒、朊病毒、类病毒之间的异同。(见 9.14 节)

应用题

1. 有哪些因素可以使出现在菌苔上的噬菌斑停止扩大?
2. 在 T4 噬菌体中，控制编码早期蛋白 mRNA 的启动子与控制编码晚期蛋白 mRNA 的启动子序列不同，为什么?
3. 温和噬菌体特点之一是产生混浊不清的噬菌斑，请从噬菌斑形成过程分析为何温和噬菌体产生混浊的噬菌斑。
4. λ 噬菌体有 3 个基因，一旦它们不再执行功能，λ 会从温和转向裂解。这 3 个基因是什么?它们的正常功能是什么?
5. 图 9.19 显示两种启动子 P_R 和 P_E 位于 *cro* 基因两侧，两个方向都可以转录 *cro* 基因，解释为什么只有由 P_R 转录得到的转录本才可以翻译出有功能的 Cro 蛋白。
6. 比较反转录病毒与正链 RNA 噬菌体病毒颗粒中存在的酶。两者都是以正链单链 RNA 作为基因组，为何编码的酶却存在差异?
7. 与细菌分裂生长类似，病毒随着感染，形成的病毒颗粒数目不断增加;但是病毒的生长曲线（图 9.9）却与图 6.8 不同。试解释原因。

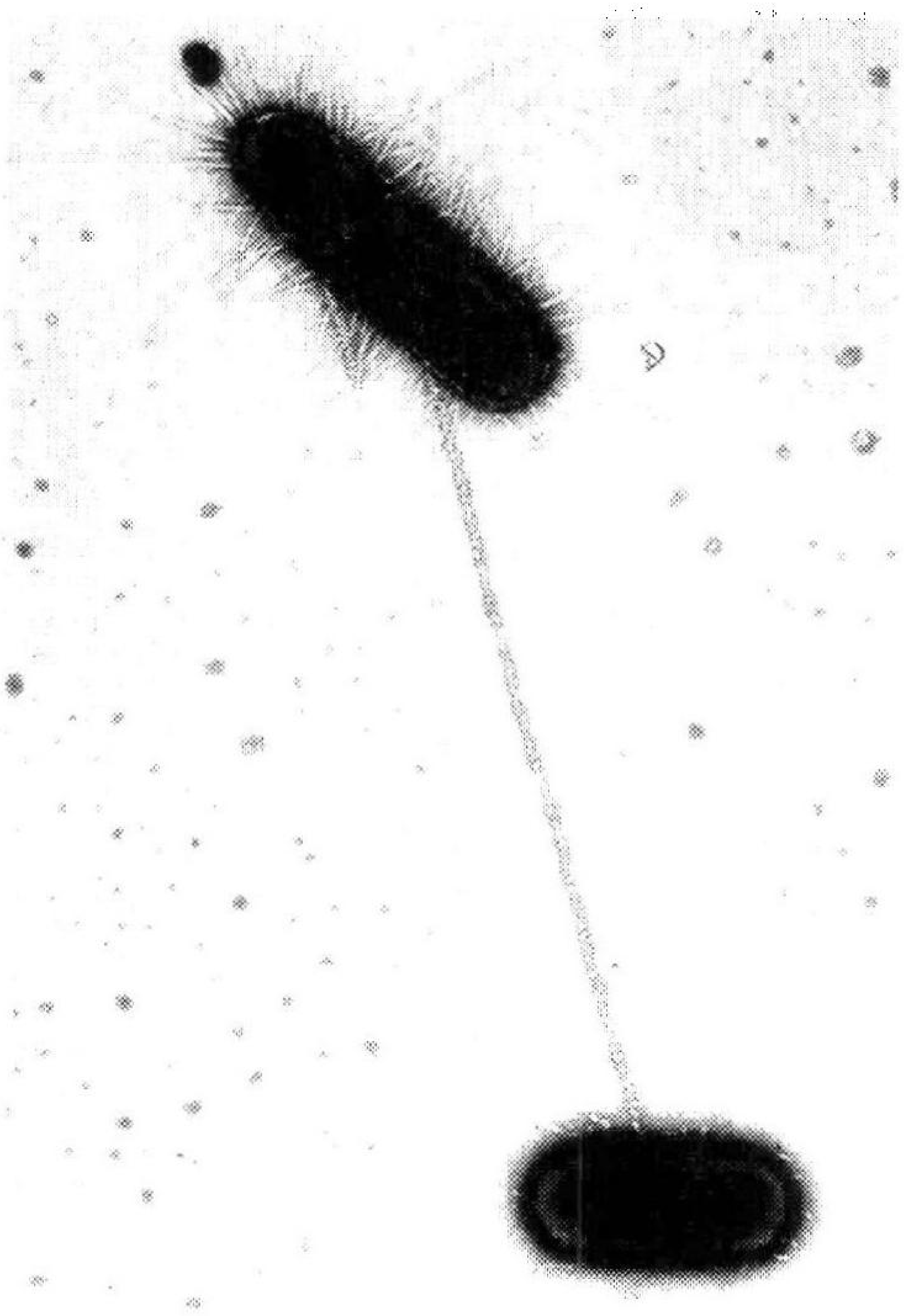
(乔文涛　译，潘　皎　校)

第二部分

进化微生物学和微生物多样性

10

细菌遗传学



要了解细菌的生长、发育和繁殖，就必须了解其遗传学。遗传学分析无论对基础理论还是对应用科学都很重要。正如两个接合的细菌所显示出的，遗传物质的交换是细菌遗传学的核心。

词汇表

营养缺陷型（*auxotroph*）：突变后表现出对某一种营养物质需求的微生物个体

克隆载体（**cloning vector**）：能够使插入其中的遗传因子进行重组和复制

接合（**conjugation**）：在原核微生物中，可通过细胞之间的接触并由质粒介导使一个细胞的基因转移至另一个细胞

基因破坏（**gene disruption**）：一种遗传学技术。通过在某基因中插入带有选择标记的DNA片段使其失活。插入的片段称为盒，插入的过程则为盒式诱变，也称为基因敲除

遗传学图（**genetic map**）：基因在染色体上的排列图

基因型（**genotype**）：一种生物明确的遗传结构；细胞的染色体及其所携带质粒的全部序列

分子克隆（**molecular cloning**）：将分离的一段DNA插入到可使之复制的载体上

诱变剂（**mutagen**）：能引起突变的物质

突变体（**mutant**）：带有突变基因组的个体

突变（**mutation**）：生物体基因组的碱基序列发生了可遗传的变化

表型（**phenotype**）：可观察到的生物特性

质粒（**plasmid**）：一种染色体以外的遗传因子，无细胞外形式

点突变（**point mutation**）：涉及一个碱基对的突变

重组（**recombination**）：来源于不同细胞的部分或全部DNA分子发生互换，或者组合成一个DNA分子的过程

筛选（**screening**）：任何利用表型或基因型对微生物进行鉴定的过程，但该过程并不抑制或提高特殊表型或基因型菌株的生长

选择（**selection**）：将微生物培养在特定条件下，使具有特定基因型的个体能够生长

鸟枪法克隆（**shotgun cloning**）：通过随机克隆DNA片段建立基因文库

定点诱变（**site-directed mutagensis**）：能够在体外构建带有特异位点突变基因的技术

转导（**transduction**）：通过病毒将一个寄主的基因转给另一个寄主的过程

转化（**transformation**）：特指细菌中游离DNA的转移过程（见第9章，选择使用）

转座因子（**transposable element**）：能从染色体的一个位点转移（转座）到另一个位点的遗传因子

转座子（**transposon**）：转座因子中的一类，带有与转座有关的基因

载体（克隆载体）（**vector**）（**as in cloning vector**）：一种DNA分子，在细胞中复制的同时，可使插入其中的DNA分子也得到复制

野生型（**wild type**）：从自然界中分离到的菌株

本章我们将介绍细菌遗传学的基本原理和技术。首先讨论突变和遗传重组，然后介绍基因如何从一个细胞转移到另一个细胞。接着，我们将探索一些基因克隆的基本技术，这些技术已经改变了从细菌到人类所有生物的遗传学研究。最后详细介绍大肠杆菌（*Escherichia coli*）染色体。

Ⅰ 突变和重组

所有生物的基因组都包含特殊的核苷酸序列，这就是它们的遗传蓝图。突变（mutation）是组成生物基因组的核苷酸碱基序列发生了可遗传的变化。在生物中，突变既

能带来有利的变化，也能带来有害的变化。同样，遗传重组（genetic recombination）也能带来生物的变化。来自两个不同基因组的遗传因子组合成一个分子的过程称为遗传重组。通过这一机制，即使不发生突变，也能够产生新的基因组合。一个细胞发生突变往往只带来很小的遗传变化，若发生重组便会有较大的改变。在两个个体之间，可以转移完整的基因，也可以转移全套基因，甚至全部染色体。总而言之，突变和重组推动着整个进化过程。

与大多数真核生物不同，原核生物不进行有性生殖。然而这些生物都有着遗传交换的机制，也可以带来基因的转移和重组。这些机制是基于侧向基因转移（lateral gene flow），也称水平基因转移（horizontal gene flow），因为基因是从供体转移到受体，而不是从母细胞转移到子细胞的垂直流动。为了检测个体之间的遗传交换，需要使用遗传标记发现基因的转移。发生遗传变化的菌株可用于遗传交换，是由于这些菌株的 DNA 上有一个或者多个突变。这些突变可能涉及一个或几个碱基对的变化，甚至整个基因的插入和缺失。

微生物遗传学一章就从突变的分子机制和微生物突变的特性开始，拉开讨论遗传交换的序幕。

10.1 突变及突变型

如前所述，生物基因组核酸的碱基序列发生了可遗传的变化称为突变。所有细胞中的核酸均为双链 DNA（见 7.1 节）。带有这种突变的菌株称为突变体（mutant），其基因型与亲代不同。基因型（genotype）是指基因组的核酸序列。另外可观察到的某种突变型特性称为表型（phenotype），突变后的表型也相应的与亲代不同，有人把这种变化后的表型称为突变表型（mutant phenotype）。从自然界中分离到的菌株称为野生型菌株（wild-type strain）。突变型既可以来自野生型，也可以来自野生型的演生株，后者为第二次突变。

基因型与表型

根据不同的突变，突变型的表型可能与亲本不同，也可能相同。按微生物遗传学中的惯例，菌株的基因型由所涉及的基因前 3 个小写字母和一个大写字母（均为斜体）表示，如大肠杆菌的 *hisC* 基因编码参与组氨酸（histidine）生物合成的 HisC 蛋白。*hisC* 基因的多个突变可表示为 *hisC*1、*hisC*2 等，数字表示突变菌株分离的顺序。每个 *hisC* 突变都不同，并且可能以不同的方式影响 HisC 蛋白。

菌株的表型用一个大写字母和几个小写字母表示，在其右上角标以正负号表示是否具有这一特征。例如，大肠杆菌的 His^+ 菌株，可以自己合成组氨酸。而 His^- 的菌株则不能合成，其生长需要补充组氨酸。前述的 *hisC* 基因突变导致 His^- 的表型，即 HisC 蛋白的功能消失。

突变型的分离：筛选与选择

实际上，诱变几乎可以改变微生物的任何一种性状。有些突变是可选择的，赋予机

体一种优势。而有些突变则不可选择，即使这些突变能给微生物的表型带来明显的变化。可选择性突变在一定的环境条件下具有优势，因此这类突变型的子代能很快地生长并取代亲本。抗药性突变是可选择性突变的例子：在含有一定浓度的抗生素培养基上，相应的抗性突变可以生长，而亲本则受到抑制甚至死亡（图 10.1a），这就是条件的选择。利用合适的环境条件，鉴别和分离那些可选择的突变型是比较容易的。因此，选择（selection）是非常有效的遗传手段，它能够从数百万个甚至数十亿个亲本细胞中分离到一个突变型。

一种原本产色素的机体突变后失去了颜色，就是不可选择突变的例子（图 10.1b）。不产色素细胞对自然形成色素的细胞来讲具选择优势，但它们与产色素的亲本同时在琼脂平板上生长时，这些菌落既无优势也没有不利。因此，我们识别这类突变的唯一方法是从大量的菌落中去发现不同颜色的菌落，这个过程称为筛选（screening）。

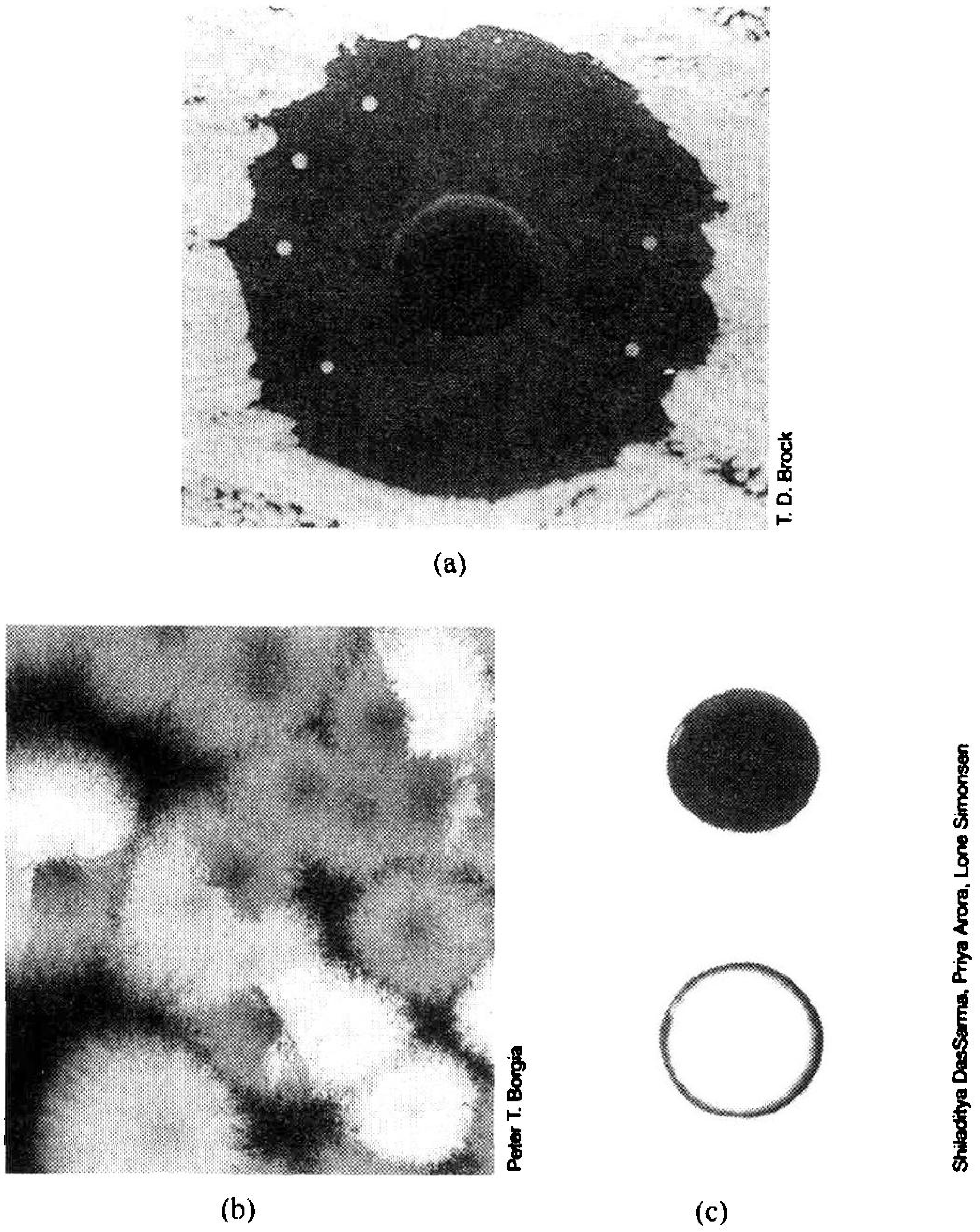


图 10.1　可选择和不可选择突变。（a）抗药性突变型的生长。在抗生素测验平板的抑菌圈中生长出极易选择的突变型。（b）非选择性突变型。构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）自然的产色素和不产色素的突变型。野生型产绿色素，不产色素的突变型为白色或无色，而黄色的突变型不能将自身产生的黄色素转变成正常的绿色素。（c）一种盐杆菌（*Halobacterium*）突变型的菌落，盐杆菌是一种古生菌。白色菌落是野生型，橙色/棕色菌落是丢失气泡的突变型（见 4.12 节）。气泡散射光源，从而掩饰了菌落本身的颜色。

营养缺陷型的分离和青霉素选择法

虽然筛选总是比选择更繁杂一些，但某些类型的突变方法可以用来筛选大量的突变型菌落。例如，营养缺陷突变型可以用影印平板（replica plating）技术检测（图 10.2）。用无菌的丝绒或滤纸，印下主平板上的菌落，再转印到缺乏营养的基本培养基平板上，在这种平板上亲本可以生长，而突变型则不长，我们便可以利用这一特征，在主平板上找到这一相应菌落（图 10.2），将之挑出来做进一步纯化鉴定。

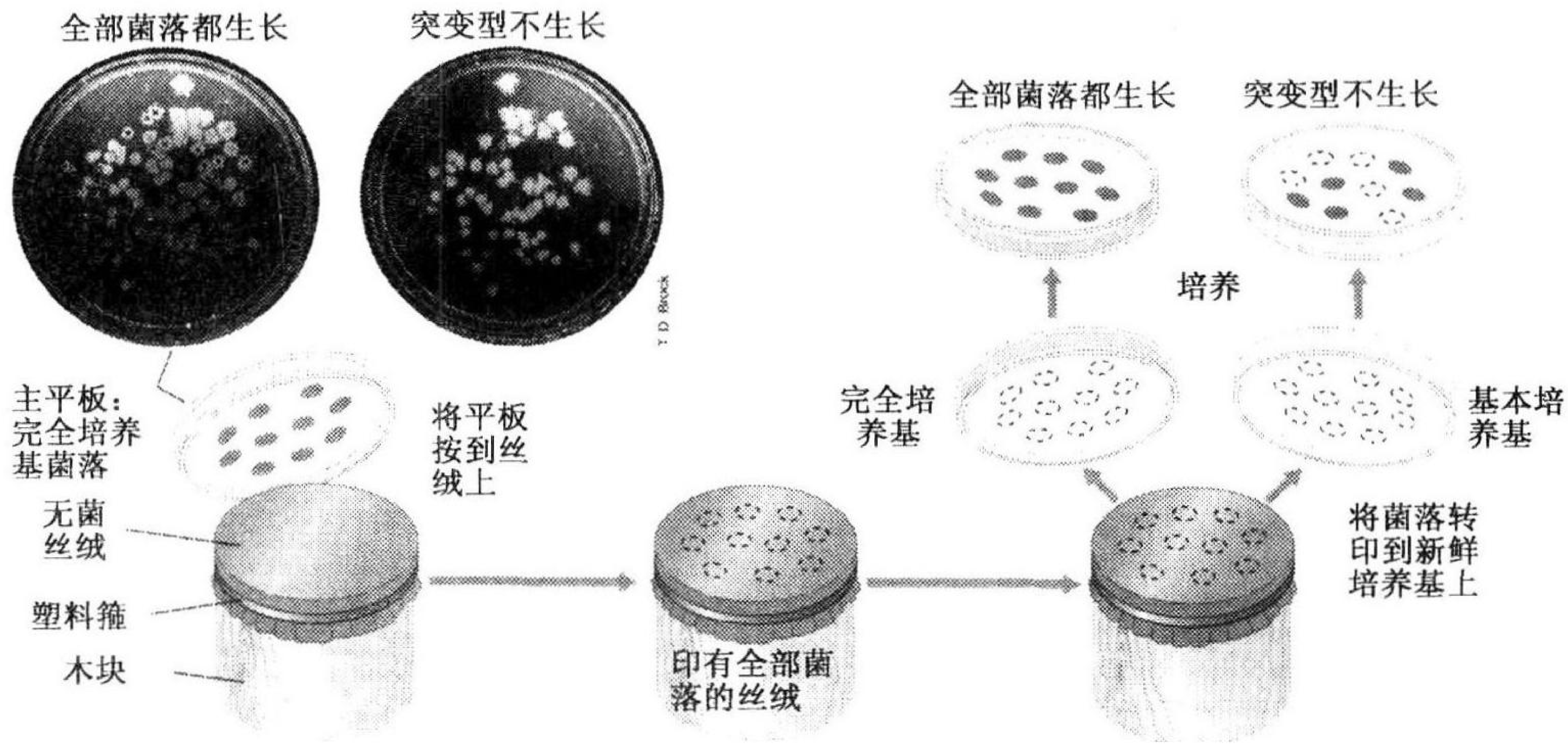


图 10.2　营养缺陷型的筛选。影印平板法用来检测营养突变型。图片：左边的照片是主平板，影印平板上不显示的菌落用 X 标记。影印平板（右边）上较之主平板缺少一种营养（亮氨酸），因此，在主平板上用 X 标记的菌落就是亮氨酸缺陷型。

突变型的生长需要某一营养物质，故称此为营养缺陷型（auxotroph），它们的野生型亲本称为原养型（prototroph）（原养型可能是野生型，也可能不是。营养缺陷型可能来自野生型，也可能来自野生型的衍生株）。例如，将 His^- 表型的大肠杆菌突变型称为组氨酸营养缺陷型（histidine auxotroph）。尽管影印平板法对筛选突变型非常有用，但此方法也是很繁琐的。

青霉素选择法（penicillin-selection method）是广泛用于分离营养缺陷型的巧妙方法。需要特殊营养的突变型，一般来讲，在与亲本细胞共同生长时处于劣势，因此没有直接筛选它们的方法。例如，组氨酸突变型在经诱变剂处理过的培养物中非常稀少，如果仅用影印平板法筛选它们需要很多时间。而青霉素选择法可以用来富集诱变细胞中的 His^- 突变型，经过该步骤之后，再用影印平板法就高效多了。那么，青霉素是怎么起到选择作用的呢？

青霉素是一种抗生素，它仅能杀死正在生长的细胞。如将青霉素加到营养缺乏的培养基中，亲本细胞就会被杀死，而突变型细胞（不生长）则不会死亡，所以在含青霉素但缺乏营养的培养基中预培养后，将此培养物中的青霉素洗涤去除，再转至含有营养的平板上培养，长出的菌落包括一些逃脱青霉素杀死的野生型细胞，但也包括一些需要的突变型。因此青霉素选择并非选择突变型而是针对亲本类型，所以它是一种负选择（negative selection）。青霉素选择法通常作为影印平板法的前期步骤，以增加获得营养

缺陷型的概率。

常见的突变型及其检测方法列于表 10.1 中。

表 10.1 突变类型

表型	特点	突变型检测
营养缺陷型	失去生物合成途径中的酶	在缺乏营养的培养基上不能生长
冷敏感	一种必需蛋白的改变导致在较低温度下失活	在较低温度(如 20℃)不能生长,但正常细胞是可以生长的
药物抗性	改变了药物的渗透性或改变了药物的目标靶及对药的解毒作用	在含有抑制生长浓度的药物中表现生长
无夹膜	失去或改变了表层夹膜	小而粗糙的菌落取代了大而光滑的菌落
不运动	失去鞭毛;鞭毛无功能	菌落紧密,不再呈现扁平、扩展的菌落
无色素突变	失去生物合成途径中的酶导致失去了一种或多种色素	表现出不同的颜色或无色
粗糙菌落	失去或改变了外层脂多糖	颗粒状不规则菌落取代了光滑且具光泽菌落
糖发酵	失去降解途径中的酶	在含糖和 pH 指示剂的琼脂上失去颜色变化
温度敏感	由于必需蛋白的改变产生对热较敏感	正常温度不能生长(如 40℃);但在较低温度(如 30℃)下仍能生长,
抗病毒	失去病毒受体	在大量病毒存在下表现生长

概念检查

突变是发生在 DNA 序列中的可遗传的变化,同时导致表型的改变。可选择性突变是在一定的环境条件下给予突变型生长优势,这在遗传学研究中非常有用。如果突变型不可以选择,就必须通过筛选来确定。

◆ 区别突变和突变型。

◆ 区别筛选和选择。

10.2 突变的分子基础

突变可以是自发的也可以是诱发的。自发突变(spontaneous mutation)的出现是由于暴露于自然射线(如宇宙射线等)而导致 DNA 碱基结构的改变。放射性氧(见 6.16 节)也能通过对 DNA 的化学修饰而影响其结构,如放射性氧使鸟嘌呤自发突变,生成 8-羟基鸟嘌呤。不过,大多数自发突变发生在 DNA 复制时,导致碱基配对的错误。

涉及一个碱基的突变称为点突变(point mutation),它可以由 DNA 的碱基置换引起。与所有的突变一样,点突变带来的表型变化取决于这一突变发生在基因中的位置、核苷酸如何改变,以及该基因编码的产物是什么。

碱基对置换

如果编码一种多肽的基因编码区发生了点突变,这一细胞表型的任何改变肯定来自

这一多肽的氨基酸序列的改变。DNA的这一错误转录到mRNA，错误的mRNA又被翻译成多肽。一个三联体密码子通过tRNA而插入一个不正确的氨基酸（见7.15节和7.16节）。图10.3显示了各种碱基对置换（base-pair substitution）的结果。

要解释突变的结果，我们必须首先回忆一下前面的内容，遗传密码是简并的（见7.14节）。正是由于这一原因，并非全部的多肽编码基因的突变都引起多肽的改变。图10.3表明DNA中一个酪氨酸密码子突变后的多种可能的结果。第一种，RNA从UAC变为UAU，这一改变并无明显的影响，因为UAU也是酪氨酸的密码子。引起这一变化的突变虽然没有对编码多肽的氨基酸序列造成影响，但实际上仍是一种突变，称为沉默突变（silent mutation）。注意这一编码区的沉默突变几乎总是改变密码子中的第三位（精氨酸和亮氨酸中有第一位的沉默突变）。

第二种，密码子中第一、第二位碱基的改变常带来多肽的明显变化。如UAC单个碱基变为AAC（图10.3）能使这一多肽中特异位点的酪氨酸变为天门冬氨酸，这一突变称为错义突变（missense mutation），因为编码多肽的信息（即氨基酸序列）改变了。若突变发生在多肽链的关键部位，这一蛋白质将失活或降低活性。但是，并非所有的置换突变均导致失活的蛋白质形成，这不但取决于置换发生在多肽链的部位，还要看是否影响了这一蛋白质的折叠以及它的活性。例如，突变发生在酶的活性位点较之发生在其他部位往往更可能导致蛋白质的失活。

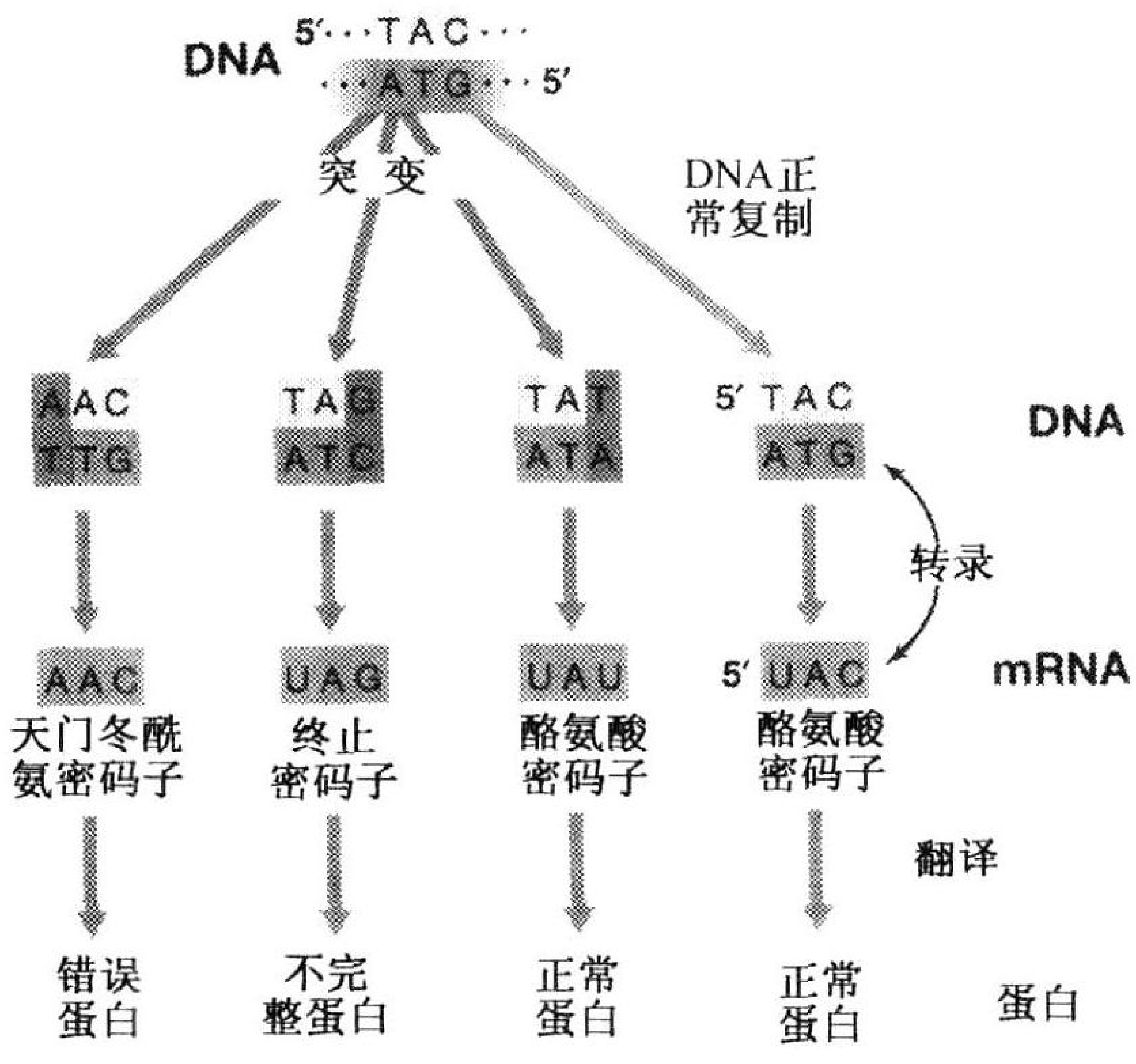


图10.3 碱基对置换在编码蛋白的基因中可能的作用。DNA单一密码子的改变产生3种不同的蛋白质。

第三种，碱基置换的结果形成一个无义（终止）密码子（nonsense codon），这样会使翻译过早停止，合成一个不完整的多肽，毫无疑问是没有功能的蛋白质（图10.3）。这一类型的突变称为无义突变（nonsense mutation），因为将一个氨基酸密码子（有意义密码子）变为一个无义密码子（表7.5）。除非无义突变发生在靠近基因末尾的位置，否则其不完整的产物是绝对没有活性的。

点突变中可根据碱基置换的性质分为转换（transition）和颠换（transversion）。转换是指嘌呤碱基之间的突变（A或G），或者嘧啶碱基之间的突变（C或T）。颠换是指

嘌呤碱基与嘧啶碱基之间的置换，反之亦然。

移码突变和其他插入或缺失突变

遗传密码的阅读是从一端开始，每3个碱基（即密码子）为一组连续的读下去，如缺失或插入一个碱基对便会导致可读框的移动，这种移码突变（frameshift mutation）会导致严重的后果。单个碱基的插入或缺失就能改变编码多肽的氨基酸序列。典型的突变方式如图所示（图10.4）。这种少数碱基的插入和缺失均来自DNA的复制错误。

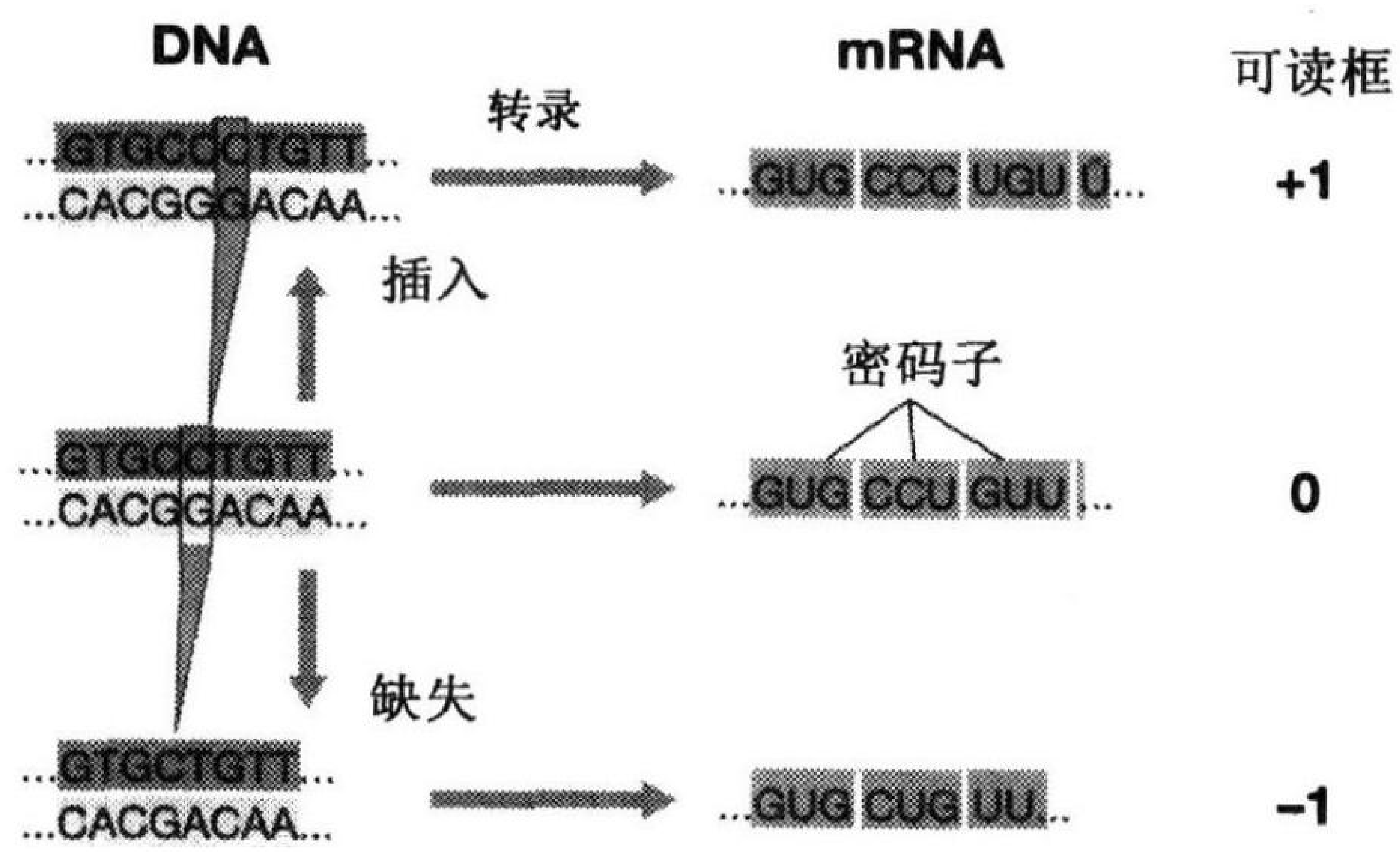


图10.4 DNA中插入或缺失突变引起的mRNA可读框的移动。由核糖体确立的mRNA可读框从5′端起始（图左侧），以3个碱基为一个单位（密码子，7.14节）进行翻译。正常的可读框用0表示，缺失或插入一个碱基的可读框分别用－1和＋1表示。要确定移码带来的影响，可参照表7.5把密码子翻译出来。

插入或缺失也可涉及成百上千万个碱基对。这种改变不可避免地导致基因功能的完全丧失。有些缺失片段大到几个基因，如果这些缺失的基因是生长必需的，则该突变将是致死的。这种缺失不能通过进一步突变回复，只能通过基因重组的方式回复。实际上，这一点正是区别缺失和点突变的方法，后者可通过进一步突变而回复，而前者是不可回复的。大片段的插入来自基因重组的错误。许多插入突变是由插入序列引起的，这是一类特殊的DNA分子，长度一般为700～1400bp，称为插入序列（insertion sequence），是一种转座因子（见7.4节）。这类插入序列的行为将在10.14节中详细讨论。

其他一些涉及大片段突变的类型多来源于错误重组而使DNA分子重排，包括大片段的染色体DNA移到新的位置，称为易位（translocation）（在真核生物中，会易位到不同的染色体上）。另外还包括倒位（inversion），即特定的DNA片段的方向发生了颠倒，但并不妨碍周围的DNA。

转座和定点突变

通过转座子致突变（transposon mutagenesis）过程也可以诱发突变，这部分内容将在本章的后半部分（见10.14节）详细地论述，这里只关注一点，若转座因子插入一个基因内，一般会使这一基因的功能丧失。转座因子可插入到染色体的许多位点，故而是微生物遗传中常使用的诱变剂。

到此为止，我们所讨论的突变都是微生物基因组的随机突变，也就是说并没有针对

任何特异的基因。然而，重组DNA技术（见10.15节～10.17节）及DNA合成的应用（见7.8节）使得诱导特异基因的特异位点发生突变成为可能。对基因组特异位点进行诱变的过程称为定点突变（site-directed mutagenesis），此部分内容将在以后章节中详细讨论（见10.18节）。

反向突变或回复突变

通过回复突变（reversion），点突变是可逆的。回复突变株（revertant）是一种由突变型表型回复成野生型（或者原养型，取决于菌株）表型的菌株。回复体有两种类型：一类为相同位点的回复（same-site revertant），即在原突变的位点上又发生了回复活性的突变（如果反向突变不仅在同一位点，而且回复成野生型序列，则称为真正回复体）。

另一类是第二位点的回复（second-site revertant），即在DNA的其他位点发生了突变。第二位点突变引起野生型表型的回复是由于阻抑基因突变。阻抑基因（suppressor）突变补偿了原始突变的作用并回复了原始的表型。已知的这类突变有：①在同一基因的其他某一位点上的突变回复了这个酶的功能，如在靠近第一次移码突变的位置发生第二次移码突变，回复了原始正确的可读框；②另一基因的突变回复了原始基因的功能；③另一基因的突变导致产生的酶，可以取代突变的酶。

与点突变不同，大片段的缺失突变都不可回复。相比较而言，大片段的插入突变则可以通过随后的缺失突变移走插入部分而回复。但是，任何大小的移码突变都很难回复成野生型，因此带有移码突变的个体遗传性很稳定。为此，遗传学家们在遗传学研究过程中，经常使用它们进行遗传杂交，以避免突变菌株的回复突变。

概念检查

突变，无论是自发还是诱发，均是由于生物基因组核酸中的碱基序列发生了变化。点突变是一个碱基对的改变，它有可能带来这一多肽中的一个氨基酸的改变，也有可能无任何变化，完全取决于所突变的密码子。在无义突变中，密码子变成终止密码子，合成不完全的多肽。缺失或插入，也包括移码突变均带来DNA分子的明显变化，常常造成基因功能的完全丧失。

◆ 点突变可以自发回复的说法表示什么意思？

◆ 编码转运RNA（tRNA）的基因能出现错义突变吗？

10.3 突变率

各种类型突变发生的频率存在着很大的差异。有些突变的发生极其稀少几乎检测不出来，而另外一些则经常发生，以至于实验者在维持保藏培养物的遗传稳定性方面遇到了许多困难。

在一个复制周期内，DNA分子中一对碱基发生复制错误的概率为10^{-7}～10^{-11}。一个典型的基因约有1000bp，因此，一般情况下，一个基因在每个世代发生突变的频率为10^{-4}～10^{-8}。例如，在10^{8}个/ml的细菌培养物中，1ml培养物中一个基因就会有很

多不同的突变型。

DNA 复制时任何单一碱基出现错误，往往引起错义突变而不是无义突变，因为大多数单一碱基置换而产生的密码子都编码其他氨基酸（表 7.5）。由单个碱基改变而引起的密码子变化的类型出现频率较高，将导致沉默突变，这是因为大部分情况下，某一氨基酸的密码子之间单个碱基的区别主要在“沉默”的第三个位置（表 7.5）。假设一个密码子可以通过单一碱基的置换变成其他 27 个密码子，一般来讲，有两个是沉默突变型，一个是无义突变，其他则都是错义突变。有些 DNA 序列，通常含有短的重复片段，DNA 聚合酶在此发生错误的频率很高，因此称为突变热点（hot spot）。热点定义为影响聚合酶行使正常功能的位点及其周围的核苷酸。

除非这一突变可以选择出来，否则用一般的实验来检测如此稀有的突变是相当困难的，因而为提高突变检出的效率则利用了多种微生物遗传的技术。下一节将见到，使用诱变剂处理后，突变的频率会明显的提高。另外，我们还将看到基因的突变率在某些情况下是可以改变的。如适应突变（adaptive mutation）在高选择压力环境下可以很容易的选择出来。适应突变是由于机体本身，为了能够在特殊的压力环境下存活而刺激产生的（见 10.4 节）。

RNA 基因组的突变

与所有细胞的遗传物质都是 DNA 相反，一些病毒具有 RNA 基因组（见 9.1 节，16.1 节，16.7 节～16.10 节和 16.15 节），这些基因组也能突变。有意思的是，RNA 基因组的突变率约比 DNA 基因组高 1000 倍，为什么会这样呢?

一些 RNA 聚合酶具有和 DNA 聚合酶一样的校对活性（见 7.6 节），因此限制了聚合酶发生错误的数量。然而，细胞中存在着多种修复系统，使发生变化的 DNA 在成为突变型之前得到纠正（见 10.4 节），但细胞中并无相应的 RNA 修复机制，因此，RNA 基因组具有极高的突变率。RNA 病毒极高的突变率产生了严重的后果。例如，致病的 RNA 病毒能够很快地突变，使病毒种群不断地改变和进化。众所周知的 AIDS 病毒——HIV，就是一种 RNA 病毒，它能够通过遗传改变影响自身的毒力，而这些遗传改变是人类医学面临的众多挑战之一（见 16.15 节和 26.14 节）。

概念检查

不同类型的突变发生的频率不同。对典型细菌而言，每个碱基对的突变率一般为 10^{-7}～10^{-11}。虽然 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶的出错频率相同，但相比 DNA 基因组，RNA 基因组明显地以很高的频率积累突变。

◆ 哪类突变最普遍，错义突变还是无义突变，为什么?

◆ 为什么 RNA 病毒的遗传性不稳定?

10.4 诱变

自发突变率非常低。有很多化学、物理和生物试剂能提高突变率，这类突变称为诱

发突变（induce mutation）。相关试剂则称为诱变剂（mutagen）。这里介绍主要的几种诱变剂及它们的作用方式。

化学诱变剂

几种主要化学诱变剂及其作用方式列在表 10.2 中。化学诱变剂分为几类，常见的一类是碱基类似物（nucleotide base analog），它的结构与 DNA 中的嘌呤和嘧啶碱基类似，但却引起错误配对（图 10.5）。当一个碱基类似物插入 DNA 分子取代正常的核苷酸后，多数情况下复制都是正常的。但在这些插入位点发生复制错误的频率比较高，导致 DNA 新链中加进错误的碱基而引入突变。随细胞分裂这条链再次复制时，便出现了突变的个体。

表 10.2 化学和物理诱变剂及作用方式

诱变剂	作用方式	结果
碱基类似物		
5-溴尿嘧啶	代替 T 结合进 DNA，偶尔会错误地与 G 配对	AT→GC，偶尔 GC→AT
2-氨基嘌呤	代替 A 结合进 DNA 与 C 配对	AT→GC，偶尔 GC→AT
与 DNA 发生化学反应		
亚硝酸	使 AC 脱氨基	AT→GC 和 GC→AT
羟胺	与 C 反应	GC→AT
烷化剂类		
单功能（如甲基磺酸乙酯）	使 G 甲基化，与 T 错误配对	GC→AT
双功能（如氮芥子气、丝裂霉素、亚硝基胍）	引起 DNA 链的交联，错误区域被 DNA 酶切除	点突变及缺失
嵌入染料		
吖啶类、溴化乙锭	插进两个碱基对之间	微量的插入或缺失
辐射		
紫外线	形成嘧啶二聚体	修复后导致错误或缺失
电离辐射（如 X 射线）	自由基作用 DNA，打断 DNA 链	修复后导致错误或缺失

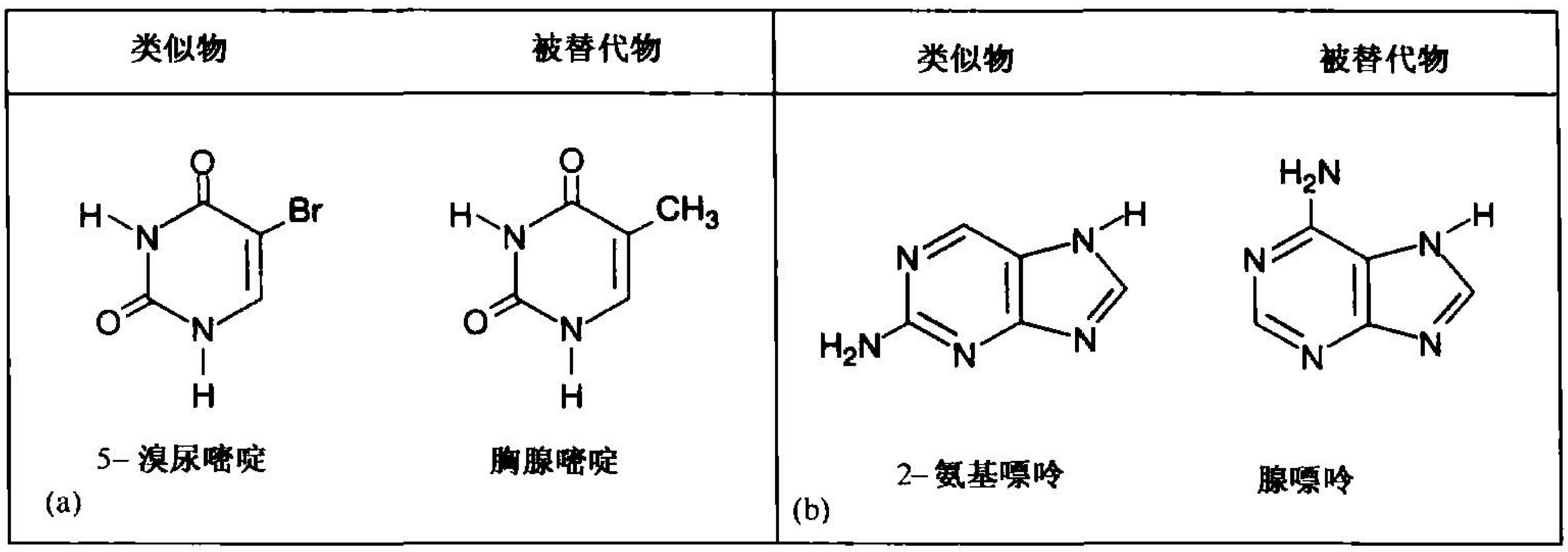


图 10.5 核苷酸碱基类似物。经常用于诱变的两种碱基类似物的结构以及它们所替代的正常的核酸碱基的结构。(a) 5-溴尿嘧啶可以与鸟嘌呤配对，引起 AT→GC 的置换。(b) 2-氨基嘌呤可以与胞嘧啶配对，引起 AT→GC 的置换。

另一些化学诱变剂可对 DNA 碱基进行化学修饰，导致出现错配或其他的改变（表 10.2）。如亚硝基胍类烷化剂（alkylating agent）（能与蛋白质及核酸中的氨基、羧基和羟基反应，代之以烷基）是强诱变剂，比碱基类似物诱发突变的频率高。因为它与碱基类似物的作用方式是不同的，它可以直接与 DNA 反应引起其改变，甚至不复制的 DNA 也同样发生改变（而碱基类似物只能在 DNA 复制时结合进去）。无论是碱基类似物还是烷化剂都可导致碱基对的置换（见 10.2 节）。

吖啶类是另一类扁平分子的化合物，其作用方式为嵌入剂（intercalating agent），可插入 2 个 DNA 碱基对之间，促使它们分开。含吖啶的 DNA 复制时，非正常构型便会出现少数碱基的插入或缺失。所以吖啶类典型地引起移码突变（frameshift mutation）（见 10.2 节）。在电泳中通常用来检测 DNA 的溴化乙锭（ethidium bromide）（见 10.12 节），也是一种嵌入式诱变剂。

辐射

有几种形式的辐射均为高效诱变剂。将其分为两大类：非电离辐射（nonionizing）和电离辐射（ionizing）（电磁）（图 10.6）。这两类辐射均被用于微生物遗传中产生突变，但非电离辐射使用得最广泛，我们首先讨论。

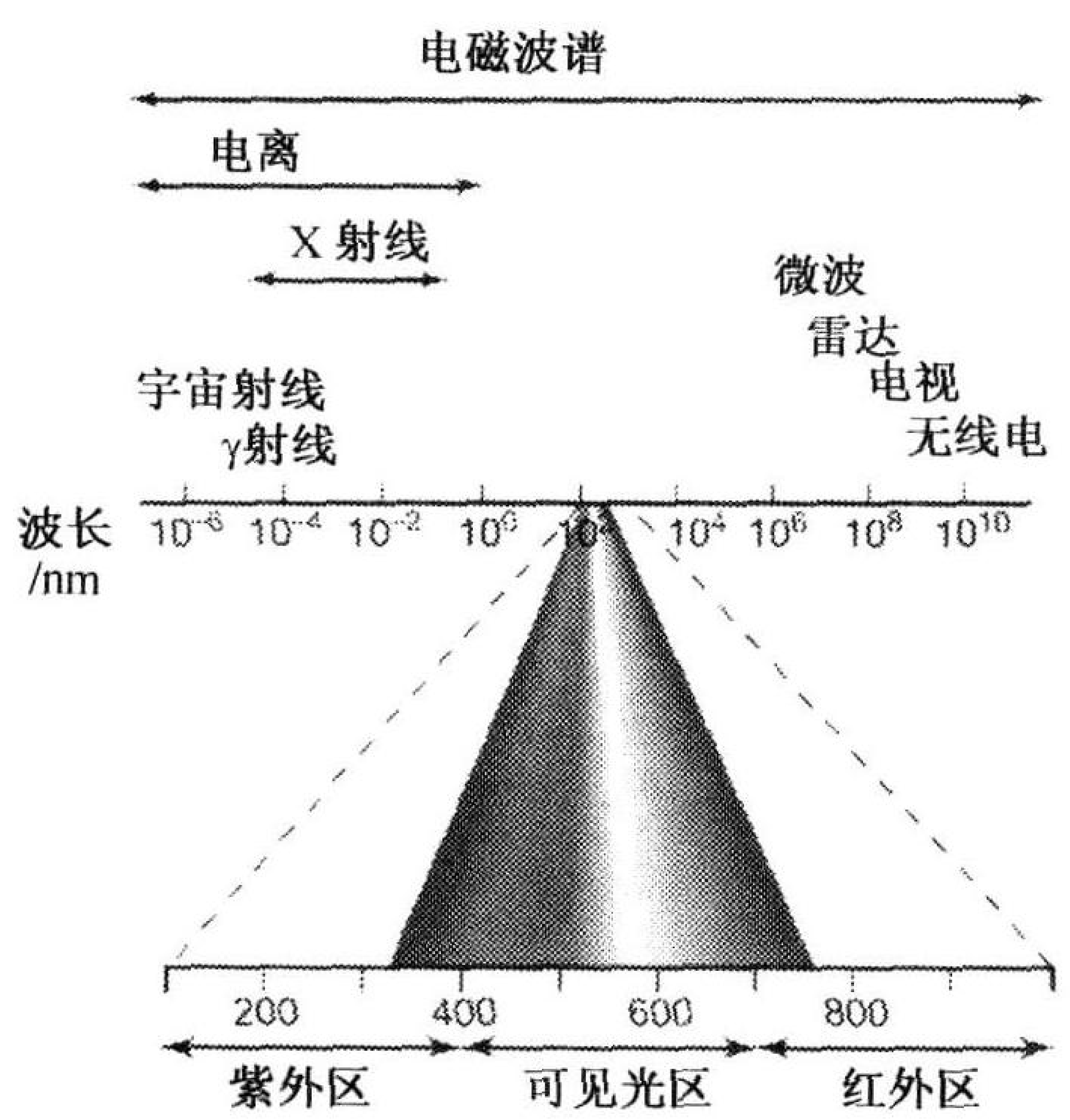


图 10.6 辐射的波长。注意紫外线辐射组成波长比可见光短。对任何电磁辐射来说，波长越短，能量越大。DNA 的最大吸收峰在 260nm。

核苷酸中的嘌呤和嘧啶碱基能很强地吸收紫外（UV）辐射，因此，DNA 和 RNA 在 260nm 处有最大吸收峰（图 7.9）。紫外辐射之所以能杀死细胞，是因为它能作用 DNA。对于紫外线的作用已有多种解释，但研究得比较清楚的一个作用是使 DNA 分子形成嘧啶二聚体（pyrimidine dimer），即同一条 DNA 链上两个相邻的嘧啶（胞嘧啶或胸腺嘧啶）共价连接，DNA 复制到这一位置时，聚合酶读错序列的概率会大增。

诱变使用的紫外线辐射源通常是杀菌灯（germicidal lamp），它能发射大量的 260nm 波长的 UV 辐射，常用剂量为能杀死群体中 50%～90%细胞的剂量（见 20.2 节），然后再从存活的细胞中筛选突变型。如果使用剂量过高，则存活细胞数就会太少，如剂量过低，将不会对整个细胞群体的 DNA 造成有效的损伤，而且可能会引起目的突变型的回复。当使用的剂量正确时，紫外线是诱发微生物突变的一种非常有用便捷的工具，并且不必去处理有毒化学物质。

电离辐射

电离辐射是一种比紫外线更强的辐射形式，包括短波射线如 X 射线、宇宙射线及 γ 射线（图 10.6）。这些射线引起水及其他物质电解离，形成化学自由基，其中最重要的

就是羟自由基 OH·（见 6.16 节）。

自由基可与细胞中的大分子反应并使其失活，大分子中最重要的就是 DNA。低剂量的电离辐射对 DNA 影响很小，但如用高剂量，DNA 就会受到多处击中而导致细胞死亡。与紫外辐射不同，电离辐射能非常容易地穿透玻璃及其他材料。正是由于这一特点，电离辐射常用于动植物的诱变（其穿透力可达到生物的生殖细胞），但在微生物中很少使用，因为电离辐射比较危险，其特性也不大适合微生物。对微生物而言，紫外线的穿透力就可以了。

DNA 修复引发的突变：SOS 系统

前面曾经讲过，突变是指遗传物质发生了可遗传的变化。如果 DNA 在合成中发生了错误，而在细胞分裂前又得到了校正，则不会出现突变型。如果一个 DNA 分子中含有嘧啶二聚体，它不会复制出 2 个均含有二聚体的 DNA 分子。如果 DNA 上的损伤得不到修复，DNA 复制受阻，细胞常常会死亡。许多细胞都有不同的 DNA 修复过程以纠正错误或修复损伤。大多修复系统属于无错修复（error-free）。然而有的修复过程是倾向差错（error-prone）的，这种修复则会带来突变。

一个复杂的细胞机制称为 SOS 调节系统（SOS regulatory system）是由于几种类型的 DNA 损伤而被激活，并开始一系列的 DNA 修复过程。在 SOS 系统中，某些 DNA 的修复是在没有模板情况下进行的，也就是说并没有碱基的配对。正如所预期的，这种修复系统会出现许多错误从而带来突变。

在 SOS 调节系统中，DNA 损伤作为求救信号引发了涉及 DNA 修复的多种细胞功能参与的协调表达作用。正常情况下，SOS 系统由 LexA 蛋白所抑制，而当 DNA 损伤时，则激活了蛋白酶 RecA 蛋白，RecA 蛋白可使阻遏蛋白 LexA 失活（图 10.7）。因为

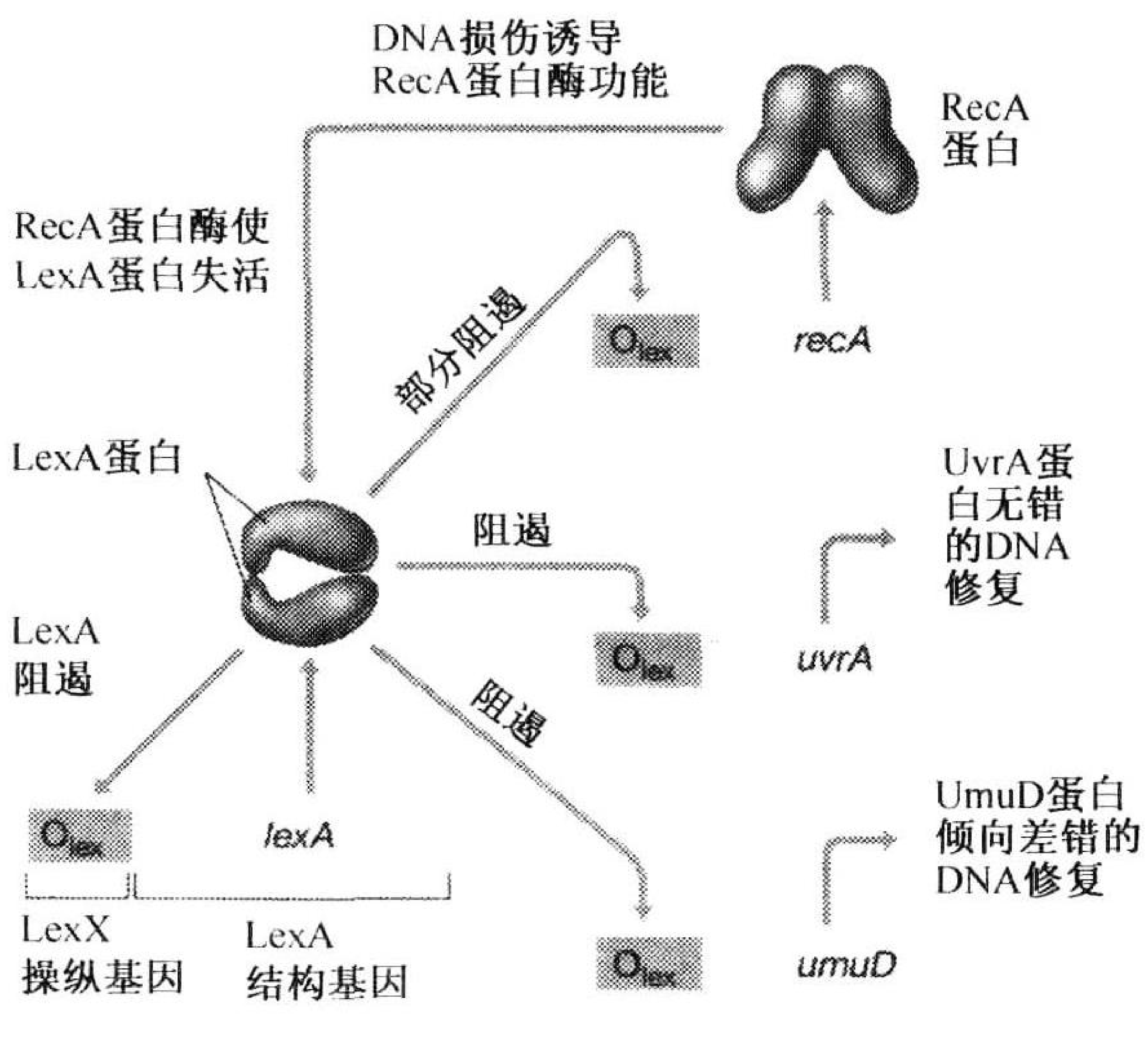


图 10.7　SOS 应答机制。 DNA 的损伤使 RecA 蛋白转变成降解 LexA 蛋白的蛋白酶，正常情况下，LexA 蛋白对 *recA* 基因和 DNA 修复基因 *uvrA* 和 *umuD*（UmuD 蛋白是 DNA 聚合酶Ⅴ的一部分）均有阻遏作用，但并非完全阻遏。LexA 蛋白存在时，少量的 RecA 蛋白也可以产生，随着 LexA 的失活，这些基因可恢复活性。

SOS 系统是一种倾向差错的 DNA 修复机制，可造成多处突变。细胞由于暴露在物理或化学试剂中而引起了 DNA 损伤，再由 SOS 调节系统修复时便可诱发突变。对大肠杆菌的突变研究得非常详细，很多突变是由于 DNA 聚合酶Ⅴ引起的，它是由 *umuCD* 基因编码的一种酶（图 10.7）。另一高度倾向差错的 DNA 聚合酶Ⅳ也是 SOS 反应的诱导酶。这些酶统称为 DNA 突变酶（DNA mutase）。

一旦 DNA 损伤修复完成，SOS 系统被抑制，新的突变也就不再产生。SOS 的作用不但能使细胞突变，同时当细胞中存在温和噬菌体时，还能对噬菌体 DNA 的复制起到调节作用（见 9.10 节）。

应强调一点，并非全部 DNA 修复都是无模板的，通常细胞中的多种修复系统均需要模板，从而导致正确无误的修复。但这类修复明显的需要更多的时间，对于化学诱变剂和大剂量的辐射造成的大规模损伤，只靠这类修复显然是不够的。

突变率的改变

DNA 复制的高保真（低错误率）对机体保持遗传稳定性是非常必要的。另一方面，绝对的保真又是不切实际的，因为这样有碍进化。因此，细胞中的突变率已演化成较低程度，但还是可以检测到，这可以使生态为了进化以达到平衡遗传稳定的需要。

实际上，在系统发育方面完全不同的生物，如超嗜热古生菌（hyperthermophilic *Archara*）和大肠杆菌，具有相同的突变率。这使我们相信，生物选择了最低的突变率是迫于进化压力。然而，事实并不是这样，生物的突变率是可以改变的。例如，实验室里可以选到一些 DNA 复制和修复超准确的突变体，但这些菌株其改进的校正和修复机制需要付出很大的代谢成本。因此实际上，自然环境是不利于超准确突变体（hyperaccurate mutant）存在的。另一方面，超准确突变体对某些生物有益，因为它们可以占据自然界中的特殊生境。如耐放射异常球菌（*Deinococcus radiodurans*）（见 12.34 节），它比大肠杆菌对紫外线辐射和电离辐射的抗性分别高出 20 和 200 多倍。这种抗性部分来自多余的 DNA 修复系统，也来自损伤核酸的清除机制，使机体能在其他生物不能存活的环境中生存，如接近浓辐射源或者暴露于强烈太阳光照的尘粒表面。

与超准确突变体相反，有些生物得益于突变率的提高。DNA 修复系统本身是由基因编码，因此也会有突变。例如，涉及校正（见 7.6 节）的 DNA 聚合酶Ⅲ的蛋白质亚基由 *dnaQ* 基因编码，该基因的某些突变可产生仍能存活的突变菌株，而且突变率提高。此类菌株称为高突变株或增变株（mutator）。导致增变表型的突变在其他一些 DNA 修复系统中同样存在。显然，在复杂和变化着的环境中容易选出增变株，因为在这些环境中，带有增变表型的菌株往往更丰富。提高突变率可能带来的某些缺点，大概都可以被其产生大量有利突变的能力所弥补。这些突变最终增加了种群的进化适应性并使机体在所处生态环境中更好的生存。

如前所述，野生型菌株在压力条件下也能诱发成为增变株。如 SOS 反应引起倾向差错的修复，因此当 SOS 反应被激活时，突变率增加。然而在某些情况下，这种 DNA 修复的副产物是必需的，在其他一些情况下增加突变率本身就具有价值。也就是说，生物能产生适应性突变（adaptive mutation）。适应性突变导致突变株的产生，突变株能够在压力条件下存活下来。很明显，在这些条件下，选择性是非常强的，因为在压力条

件下，生物可能存活下来的唯一选择就是增加突变率，否则就可能死亡。

概念检查

能提高突变频率的化学、物理及生物因素都是诱变剂。诱变剂可以多种形式改变DNA，然而这种改变除非是可遗传的，否则不一定造成突变。一些 DNA 的损伤若得不到修复会使细胞致死。细胞中既有倾向差错的 DNA 修复系统，也有高保真 DNA 修复系统。

◆ 诱变剂是如何起作用的？

◆ 在快速变化的环境中，为什么增变株更可能存活下来？

10.5 诱变及致癌作用：埃姆斯试验

细菌突变体的实际应用是鉴别环境中潜在的有害化合物。因为从大量的群体中选择突变型的方法灵敏性很高，所以可利用细菌来筛选可能具有诱变作用的化学物质。这也是因为许多化学物质是致癌的，可引起人和动物的癌症。

无论是天然的还是人工合成的化学物质种类繁多，人们在从事工农业生产活动中会接触到它们。充分的证据表明，大多数的人类癌症由环境引起，并且多数癌症与各种化学因素有关，因此对化学致癌物进行检测是急需和重要的。一种化合物是诱变剂，但并不一定是致癌物，虽然这种相关性很高，因为对细菌有诱变作用的同时也告诫对人类的危险性。最初建立细菌检测致癌物方法的是位于美国伯克利的加州大学的一组科学家，指导者是布鲁斯·埃姆斯（Bruce Ames），因此致癌物的诱变性试验也称埃姆斯试验（Ames test）（图 10.8）。

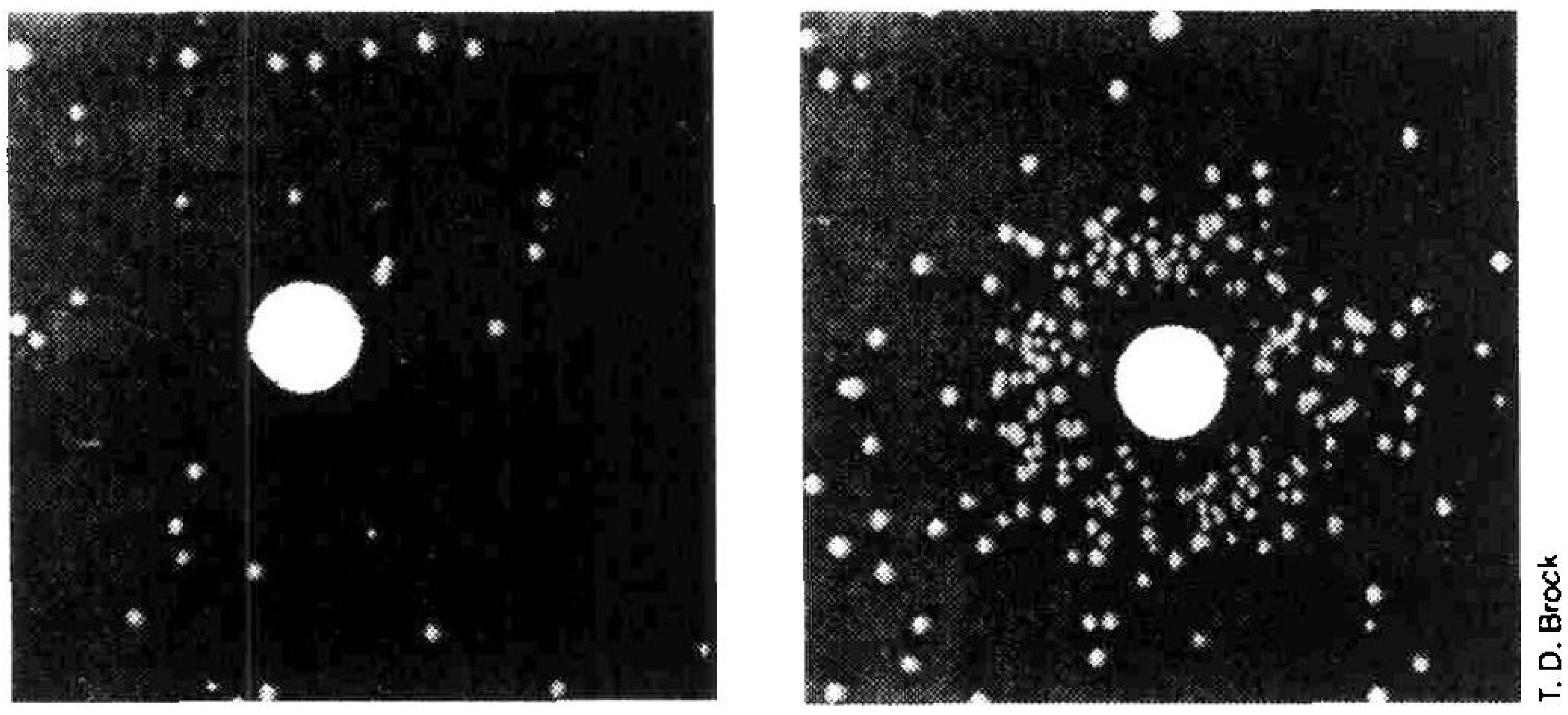


图 10.8 埃姆斯试验用于评价化学物质的诱变性。两块平板上是肠沙门氏菌（*Salmonella enterica*）组氨酸（营养缺陷型）培养物，培养基中不含组氨酸，只有回复成野生型的细菌才能生长。可见两块平板上均有自发回复突变菌株出现，但检测平板（右）中央的圆滤纸片上吸入的化学物质提高了回复突变的频率，可见滤纸片周围的大量菌落。这些回复突变菌株并非紧邻滤纸片，因为靠近滤纸片处的诱变剂浓度高，细菌是致死的。左边的平板是阴性对照，圆滤纸片吸入的是水。

埃姆斯试验的方案

检测化学诱变作用的标准是确定可疑诱变物是否能提高营养缺陷型菌株的回复突

变率。所用测试菌株必须是点突变，因为点突变能以同样的突变率发生回复突变，这点很重要。营养缺陷型菌株被涂在缺乏相应物质（如氨基酸）的培养基上，将不会生长，甚至涂上大量的细菌也不会出现菌落。如果出现了回复突变体则能长成菌落，因此将 10^8 个细菌涂在上述平板上，有可能出现 10～20 个回复菌落（图 10.8 左）。如果一种化学诱变剂能使回复突变率提高，出现的菌落数将会增加。埃姆斯试验中的主要工具是肠沙门氏菌（*Salmonella enterica*）组氨酸缺陷型（图 10.8）和大肠杆菌色氨酸缺陷型。

为使埃姆斯试验更加准确高效，在此系统中又加入了两个因素：其一是所用测试细菌只能利用倾向差错途径修复 DNA 的损伤（见 10.3 节）；其二是利用肝酶制备物将化学物质转变成有活性的诱变（可能致癌）形式再进行测试。充足的证据证明，很多致癌物本身并非直接就有致癌和诱变作用，但经过人体内一些化学反应后会转变成有活性的物质，这些变化主要发生在肝脏，肝脏的双功能加氧酶（mixed-function oxygenase）正常情况下有解毒作用，形成环氧化物或其他有活性的化合物，这些物质极易与 DNA 反应（因此诱发有机体突变）。

进行埃姆斯试验，首先从鼠肝中获得酶，用以激活待测化合物，然后将激活后的化合物吸入滤纸片，将纸片放于已涂好细菌的平板中央。过夜培养后，观察滤纸片周围回复突变的菌落圈，来决定化合物的致突变性（图 10.8）。测试时需取待测物的几个不同浓度，还应有适当的阳性（已知的诱变剂）和阴性（非诱变剂）对照，因为各种化合物的诱变活性不同，过高浓度会致死。埃姆斯试验检测过广泛的化学物质，作为确定可疑致癌物，它是一个非常有效的筛选手段。

概念检查

埃姆斯试验利用敏感细菌测试系统检测环境中的化学诱变剂。

◆ 埃姆斯试验为什么检测回复突变率，而不检测正向突变率？

◆ 检测诱变剂对于预防癌症有什么意义？

10.6 遗传重组

重组（recombination）是遗传物质之间基因的物理交换。本节重点是同源重组（homologous recombination），即不同来源的两段同源 DNA 序列之间的遗传交换。同源 DNA 是指相同或相近的 DNA 序列，因此两个 DNA 分子之间有很长片段的碱基配对。这种重组的过程在经典遗传学上称为“杂交”。

同源重组的分子行为

已经在原核生物、病毒和一些真菌，尤其是酵母菌中深入地研究了重组。细菌参与同源重组的蛋白质是由 *recA* 基因编码的 RecA 蛋白，此种蛋白质在倾向差错的 SOS 修复系统中曾经提到过（见 10.4 节）。已经证明，RecA 是几乎所有同源重组途径中的必需蛋白质，已经在包括古生菌在内的所有原核生物中检测到了类似的 RecA 蛋白，并且

在酵母菌和较高等真核生物中也发现了类似蛋白质。

同源重组的分子机制见图 10.9。重组过程开始时首先在一条 DNA 链上出现缺口（由内切核酸酶产生），然后具有解旋酶活性的蛋白将带缺口的链与另一条链分开（见 7.6 节）。在某些情况下一类特殊的酶，如大肠杆菌中的 RecBCD 酶既有内切核酸酶活性，又有解旋酶活性。单链结合蛋白（见 7.6 节）结合于单股链上，然后 RecA 蛋白也结合在单链片段上，这一复合物很容易与邻近 DNA 双螺旋中的互补序列退火，同时离开原来的配对链（图 10.9）。此过程常称为链侵入（strand invasion），并导致很长片段

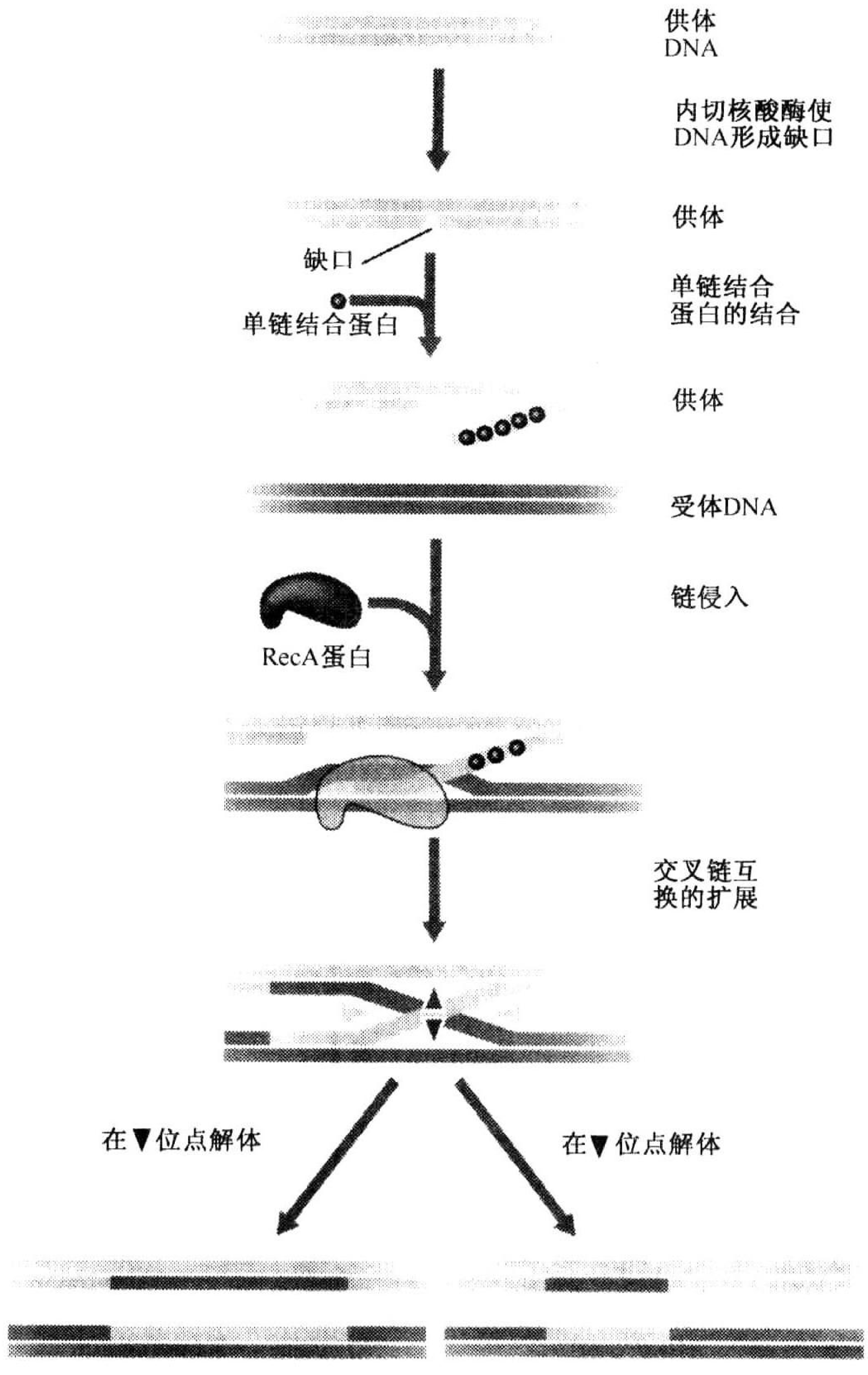


图 10.9 遗传重组的分子机制简述：同源重组。同源 DNA 分子配对及 DNA 片段交换，配对片段的切割及再次联会。图中显示了此过程需要的两种蛋白质：单链结合蛋白（SSB）及 RecA 蛋白，其他的相关蛋白质则没有显示。此图示没有标尺，发生配对的碱基可以超过几百或几千个。交联的 DNA 分子被解体要经过切割和连接。注意有两种可能的结果，这取决于解链过程中两条链的切割位置。

的 DNA 分子配对。配对之后，同源 DNA 分子发生交换，形成重组中间体。这一中间体含有扩展的杂合双螺旋（heteroduplex）区域，其中每一条链来自不同的染色体，此过程需 DNA 聚合酶和连接酶的参与。最终连在一起的分子在核酸酶和连接酶的作用下分离，形成两个重组 DNA 分子。

同源重组对基因型的影响

同源重组后出现新的基因型，则两个同源序列在遗传上有差异。在二倍体真核细胞（见 14.7 节）中最明显，它们具有两套染色体，分别来自不同的亲本。而在原核细胞中，遗传不同的同源 DNA 分子能够以不同的途径结合在一起，但遗传重组过程同样重要。原核生物中发生同源重组，是因为供体染色体的同源 DNA 片段可能通过下述 3 种方式之一转移到受体细胞：转化（见 10.7 节）、转导（见 10.8 节）或接合（见 10.11 节）。只有供体 DNA 片段转移进受体细胞中之后，才能发生同源重组。在原核生物中，因为转移的仅为染色体的一个片段，如不发生重组，此片段就会丢失，因为它不能独立的复制。因此对原核生物而言，转移是得到重组生物的第一步。

重组的检测

若要察觉 DNA 片段的物理交换，则重组后细胞的表型必须不同于任一亲本。遗传杂交中，作为受体的菌株通常必须缺少重组子具备的一些可选择特性。例如，受体不能在一种特殊的培养基中生长，而利用这一条件可选择重组子。各种选择性标记如药物抗性、营养缺陷型等曾在 10.1 节中讨论过。

有一种相当敏感的筛选方法，即使是非常少的重组细胞也能从大量的非重组细胞中选择出来（图 10.10）。这里唯一的要求是回复突变率要低，因为回复体可以生长。为解决这一问题，通常采用双重突变体（double mutant），即带有两种不同突变的菌株，因为两个突变的回复很难同时出现在一个细胞中。另外也可以使用移码突变菌株，因为它们的回复率相当低。多数的细菌遗传学技术，不但可以筛选出合适的突变体，而且选

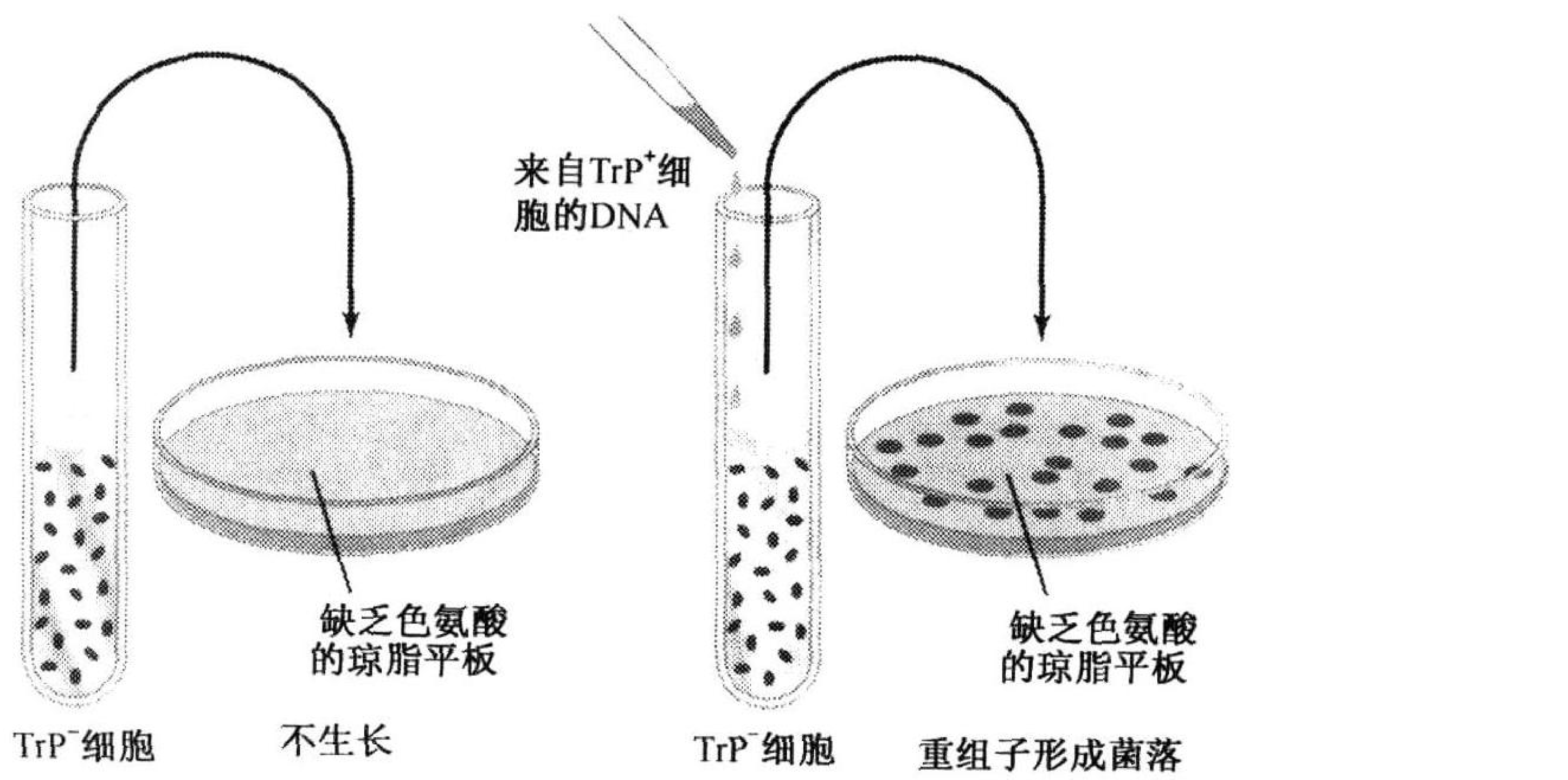


图 10.10 选择性培养基如何从大量的亲本中检测稀有的重组子。在选择培养基上，只有少数重组子可以生长。该方法可为遗传分析提供极高的分辨率，一般仅用于微生物中。图中阐释的遗传交换类型是转化，此部分将在 10.7 节进行讨论。

择性培养基可以有效地检测遗传重组。正是因为具有强有力的选择手段，故一次杂交可以利用10亿个细胞，所以重组分析是微生物遗传学家极其重要的工具（见10.7节～10.12节）。

概念检查

当两个遗传上有区别，序列上又极其相似的DNA分子结合进同一细胞时，便会发生同源重组。重组是一个重要的进化过程，细胞具有特异的机制以保证重组的发生。原核生物的重组机制，首先要通过转导、转化和接合途径带来DNA的转移。

◆ 在所有原核生物中发现的哪一种蛋白质可促进同源重组中的DNA配对？

◆ 真核生物的重组涉及整个染色体，而原核生物却不是这样，请解释。

Ⅱ 原核生物中的遗传交换

为进行遗传学分析，微生物遗传学家必须将具有不同基因型（和表型）的菌株进行杂交并寻找重组子（图10.10）。原核生物中3种已知的遗传交换机制有：①转化（transformation），DNA从一个细胞释放出来并被另一个细胞吸收（见10.7节）；②转导（transduction），供体DNA通过病毒进行转移（见10.8节）；③接合（conjugation），转移过程涉及细胞与细胞的接触及供体细胞中的接合质粒（conjugative plasmid）（见10.9节～10.12节）。这些过程的对比见图10.11。

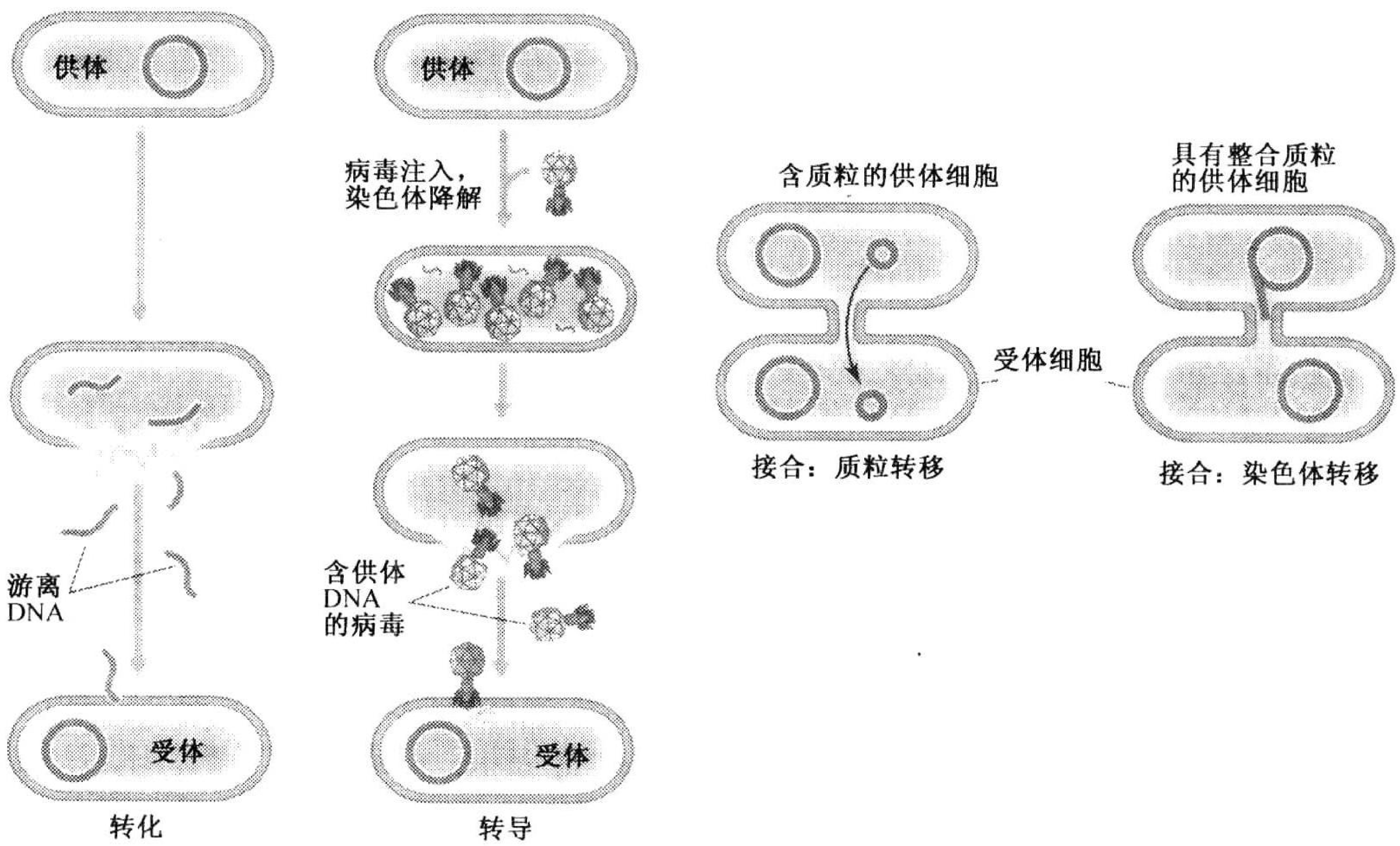


图10.11　细菌DNA从供体转移至受体的过程。图中仅显示了转移的起始步骤，DNA如何整合进受体的详述请见正文。

10.7 转化

转化是指游离的DNA结合到受体细胞中，并带来遗传性状改变的过程。许多原核细菌可以自然转化，包括某些革兰氏阳性和阴性菌及一些古生菌。原核生物的DNA在细胞中是一个大分子，当温和裂解细胞后，DNA便从细胞中涌出（图10.12）。因其分子很长[如枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的DNA分子长1700μm]且极易断裂，即使用温和的方法提取，枯草杆菌4.2Mb的染色体也会断成很多约10kb的片段。一个基因的长度约为1000个核苷酸，因此纯化后的DNA片段上会有大约10个基因，这是典型的可转化分子的大小。一个细胞只能结合一个或少数几个片段。因此一次转化过程，受体细胞只能获得供体细胞全基因组的极少部分。

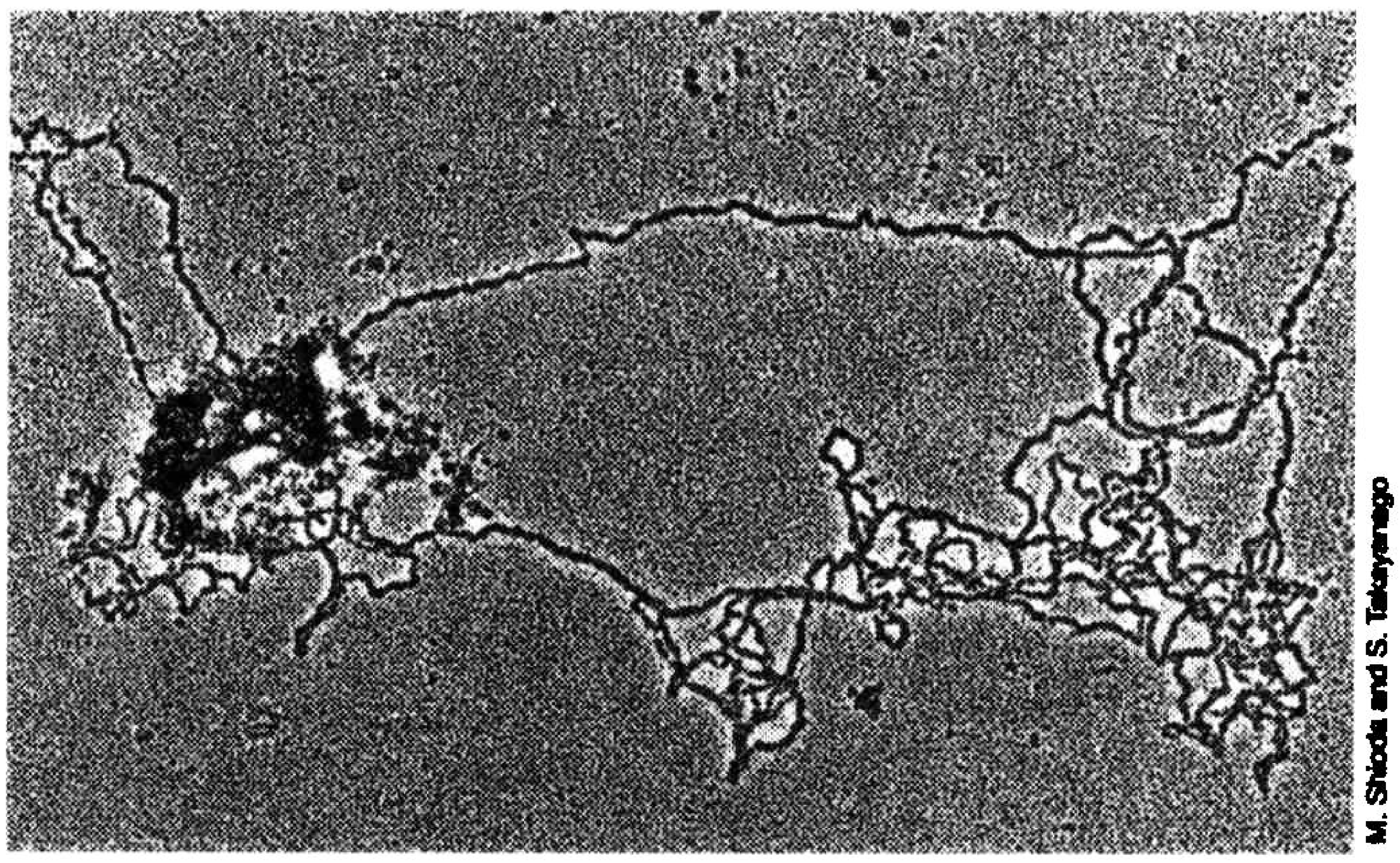


图10.12 电镜下的原核生物染色体。环状染色体来自一种古生菌超嗜热菌硫化叶菌（Sulfolobus）（见13.9节），也可参考图10.17。

分子生物学历史中的转化

很久以前就知道真核生物的遗传重组，但了解细菌遗传重组是近代的事件。转化的发现是生物学中开创性的事件之一，因为转化实验证明了DNA是遗传物质（图10.13）。这一发现是分子生物学和现代遗传学的里程碑，因此在这儿回顾一下。

20世纪20年代后期，英国科学家Frederick Griffith最早获得细菌转化的证据。肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）是可侵入人体的具有多糖荚膜的细菌（见4.10节）。Griffith长期从事这方面的研究，分离到的缺少荚膜的突变型则不会引发感染。这种突变型在琼脂上的菌落是粗糙的，故称为R型。相反，具荚膜的菌株为光滑型（S）。用少量的S细菌注射小鼠，1～2d后小鼠均死于严重的肺炎链球菌感染，而注入大量的R细菌并不引起小鼠死亡。Griffith证明，如将加热杀死的S细胞与活的R细胞同时注射，同样是致命的感染，而从死鼠体内分离出的细菌却是S型（图10.13）。从这个实验中分离出来的S细胞的荚膜总是与加热杀死的S细胞的相同，所以Griffith得出结论，R型细胞转化为新的类型，整个过程具有遗传事件的所有特性。从此，进入了发现DNA的阶段。

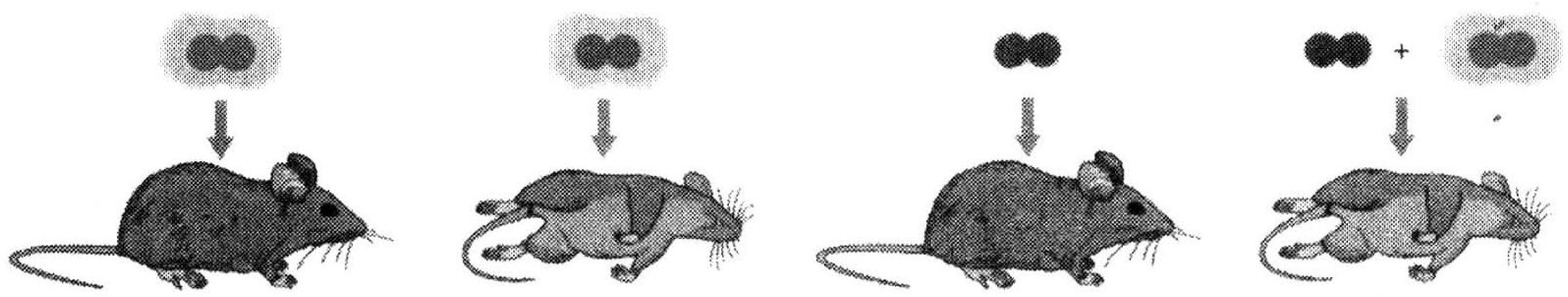


图 10.13 Griffith 的肺炎链球菌实验。活的光滑型（S）细菌具有荚膜能杀死小鼠，因为免疫细胞不能杀死包在荚膜内的细菌；这些细菌在肺部繁殖扩散并引起致死性肺炎。粗糙型（R）细菌没有荚膜，不能致病。但活的 R 型和死的 S 型细胞结合起来却能杀死小鼠，并能从动物体内分离出活的 S 型细胞。编码荚膜产物的 DNA 从死的 S 型细胞中释放出来，被 R 细胞吸收，并将 R 细胞转化成 S 型细胞。

Oswald T. Avery 和他的同事解释了肺炎链球菌转化的分子机制。在纽约洛克菲勒研究所的这些科学家们于 20 世纪 30 年代进行了一系列研究。1944 年 Avery，C. M. MacLeod 及 M. McCarty 发表了当时已达最高水平的优秀论文。Avery 等证明，转化可在试管中进行，而不必在小鼠体内，加热杀死细菌后的无细胞提取物也可引起转化。经过一系列艰苦的生化实验工作，终于纯化出了无细胞提取物中的活性片段，而且证明是 DNA。纯化后的 DNA 转化活性非常高，且用量甚微。随后洛克菲勒研究所的其他学者也证明，肺炎链球菌可转化的不仅限于荚膜一个特征，生物体的其他遗传特性如抗药性和糖发酵同样也可以转化。

1953 年，James Waston 和 Francis Crick 宣布了他们的 DNA 结构模型，为 DNA 如何作为遗传物质提供了理论依据。因而，Griffith 在细菌学方面的研究，Avery 在生物化学方面的研究和 Waston 和 Crick 在物理化学方面的研究，使 DNA 作为遗传物质的概念更加充实可信。随后几年，这项工作便涉及分子生物学和分子遗传学的全面领域。

感受态（competence）

即使在可转化的属内，也仅限于某些种或部分菌株可以转化。可以接受 DNA 分子并被转化的细胞称为感受态细胞（competent），感受态是生物的一种遗传特性。在大多数天然可转化的细菌中，感受态是可以调节的，并有特殊蛋白质在吸收和加工 DNA 过程中起着作用。感受态特异蛋白包括一种与细胞膜相关的 DNA 结合蛋白、一种细胞壁自溶素和各种核酸酶。在很容易转化的枯草杆菌中，自然感受态形成途径是群体感应系统（quorum-sensing system）（一个与细胞密度相关的调节系统，见 8.10 节）的一部分，该系统由双组分调控系统（two-component regulatory system）（见 8.12 节）控制。细胞在生长过程中产生并分泌一种小肽，这种小肽积累到高浓度后诱发细胞形成感受态。芽孢杆菌属（*Bacillus*）约 20%的细胞可呈现感受态而且可持续几个小时，而链球菌属（*Streptococcus*）只需要短时间的培养，100%的细胞具有感受态。

已知能高效自发转化的细菌仅有几种，如不动杆菌属（*Acinetobacter*）、固氮菌属（*Azotobacter*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、链球菌属（*Streptowccus*）、嗜血菌属（*Haemophilus*）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）及栖热菌属（*Thermus*）等，它们都是自然的

感受态细胞并很容易进行转化。相反，很多原核生物在自然状态下根本不能转化。有意思的是大肠杆菌和其他很多革兰氏阴性菌都属于这一类。但是，在高浓度的钙离子和低温条件下处理几分钟，就能使大肠杆菌转化。用这种方法处理的大肠杆菌可吸收双链DNA，故质粒DNA转化时呈现较高的频率。正如我们后面将要看到的，这一发现非常重要，因为它使DNA能转进大肠杆菌，并作为一种遗传工程的工具在生物技术领域中得到应用（见第31章）。

转化DNA的摄取

在转化中，感受态细胞首先可逆地结合DNA，很快这种结合就变为不可逆。感受态细胞结合的DNA数量比非感受态多1000倍。前面曾讨论过，转化片段的大小要比整个基因组小得多，而且在摄取过程中还会进一步降解。每个肺炎链球菌细胞仅可以结合约10个分子的双链DNA，每个大小为10～15bp。而最终摄取进细胞的单链片段则变为8bp，另一条互补链被降解。混合的DNA片段在吸附时是相互竞争的，如果在转化DNA中加入不含转化标记的额外的DNA，则获得的转化子数将会降低。

制备好的转化DNA，每100～300个片段中才有一个片段带有所研究的遗传标记。因此即使DNA的浓度达到饱和状态，甚至给予最佳条件，也不可能使全部被转化的细胞获得遗传标记。到目前为止最高的转化频率是20%，实际上多数为0.1%～1.0%。但因为受体的数量很高，即使如此低的效率也能容易地检测到。转化DNA的最低浓度大约是0.01ng/ml，如此低的浓度用化学方法是难以测定的。

有趣的是，流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）转化过程的不可逆结合和摄取DNA时，需要11个碱基的DNA片段。此片段在这一属细菌的染色体上已发现，而且多得使人难以置信。嗜血杆菌属的基因组已全部完成测序（见15.4节）。此证据说明，至少某些细菌的感受态能在自然环境中呈现，因此认为转化在自然界的水平基因转移中起着重要作用，并非是实验室的人工产物。总而言之，通过促进基因之间新的结合，可自然转化的细菌增加了整个微生物群落的多样性和适应性。

转化DNA的整合

转化DNA依赖DNA结合蛋白吸附到细胞表面。吸附后，有的双链片段被摄取，有的一条链被核酸酶降解，另一条链被摄取，这取决于细菌的种类（图10.4）。吸收进细胞的DNA仍保持与感受态特异蛋白结合在一起，这可以防止核酸酶的作用，直到到达染色体时由RecA蛋白接替。随后的重组过程将DNA整合进受体基因组（图10.14；也可参见图10.9）。杂合双链DNA复制时，便形成一个亲本型和一个重组型的DNA分子。随着细胞分裂，后者则成为转化子细胞，并从遗传上发生了改变，从而与亲本基因型不同。这种过程仅限于小片段的线性DNA分子，很多能自然转化的细菌一般不能转化质粒DNA，因为质粒要复制就必须保持双链环状的形式。

转染

细菌转化用DNA来源于细菌病毒而不是其他细菌，这一转化过程称为转染（transfection）。若DNA来自烈性噬菌体，转染导致病毒产生，可用标准的噬菌斑方法

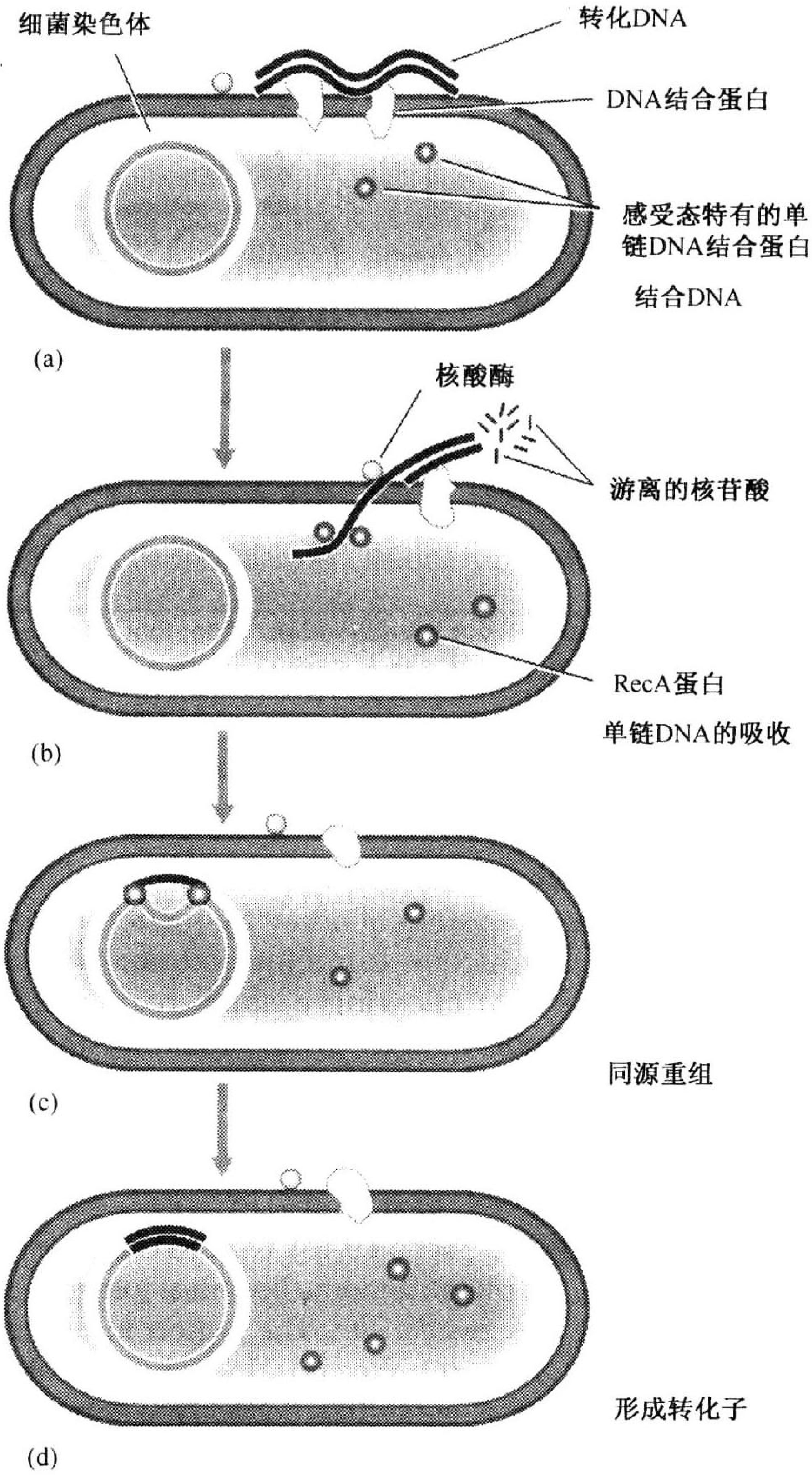


图 10.14 革兰氏阳性菌的转化机制。(a) 细胞膜上的 DNA 结合蛋白吸附双链 DNA。(b) 双链的一条链进入细胞，另一条链被核酸酶降解。(c) 细胞中的单链 DNA 与特异蛋白结合，在 RecA 蛋白作用下与染色体同源区域重组。(d) 形成转化子。

来检测（见 9.4 节）。转染可用于转化及重组机制的研究，因为所用的噬菌体基因组很小却含有大量同源的 DNA 分子。而常规转化中所用的 DNA，是染色体随机断裂形成的长短不同的混合体，这就使得研究转化机制的实验更加复杂。

概念检查

某些原核生物可呈现感受态，可吸收其他细菌所释放的游离 DNA。供体 DNA 结

合进受体细胞需要单链结合蛋白、RecA 蛋白和其他一些酶。只有感受态细胞才可以转化。

◆ 转化中的供体细胞很可能已经死亡，请解释。

◆ 即使天然可转化细胞的感受态通常也是可诱导的，这是什么意思？

10.8 转导

转导是以细菌病毒（噬菌体）为媒介将一个细胞的 DNA 转移到另一个细胞。这种寄主基因转移有两种方式：第一种称为普遍性转导（generalized transduction），宿主基因组的任何 DNA 片段，都可以成为成熟病毒粒子中的一部分 DNA，从而取代病毒基因组；第二种称为特异性转导（specialized transduction），仅由部分温和噬菌体引起。在特异性转导中，宿主染色体的特异片段整合进病毒基因组，通常会置换某些病毒基因。上述两种类型形成的转导病毒一般是无感染能力的，因为病毒的某些或全部必需基因被细菌基因所取代。

普遍性转导中的供体基因，如果不与受体染色体同源部分重组则会丢失，因为它不能独立复制，也并非病毒基因组的一部分。特异性转导也可发生同源重组，使供体 DNA 成为温和噬菌体 DNA 的一部分，并会有两种存在方式：①以溶原化的方式整合进宿主染色体（见 9.10 节）；②以裂解感染方式在受体中进行 DNA 复制。

多种细菌都能进行转导，包括的属有：脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）、埃希氏菌属（*Escherichia*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、红球菌属（*Rhodococcus*）、红细菌属（*Rhodobacter*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、黄色杆菌属（*Xanthobacter*）及甲烷嗜热杆菌属的一个种（*Methanothermobacter thermoautotrophicus*）。并非所有的噬菌体都能转导，也并非所有的细菌都能被转导，但这一现象已经很广泛了，转导在自然状态下对基因转移起到了重要的作用。

普遍性转导

普遍性转导中，供体染色体上的任何基因都可以转移进受体。首次发现普遍性转导并深入研究的是用噬菌体 P22 感染肠沙门氏菌（*Salmonella enterica*），对噬菌体 P1 引起大肠杆菌的普遍性转导也进行了广泛的研究。图 10.15 是如何形成转导颗粒的一个实例。当一个细菌细胞被一个噬菌体感染时，烈性生长周期则开始。然而，在此过程中，负责包装病毒 DNA 的酶偶尔误将宿主 DNA 包装进噬菌体头部，这个病毒粒子称为转导颗粒（transducing particle）。当细胞裂解时，这些颗粒随正常的（潜在地裂解）病毒颗粒一同释放出来，因此裂解液是含有正常和转导病毒的混合物。

转导颗粒中不含病毒 DNA，不能像正常病毒一样感染和裂解细胞，而被称为缺陷型。用上述裂解液去感染受体细胞，多数细胞带有正常病毒，而少数细胞得到的是由转导颗粒包装的前一宿主细菌的 DNA 片段，尽管这一 DNA 片段不能自我复制，但它可与新宿主的 DNA 重组。裂解液中所含的缺陷转导病毒的数量很少，而且每一转导病毒所携带的供体 DNA 也仅为很小的片段，所以由转导病毒带有特定基因的概率相当低，通常为 $10^6 \sim 10^8$ 个细胞中才能得到一个细胞带有所期望的转导标记。

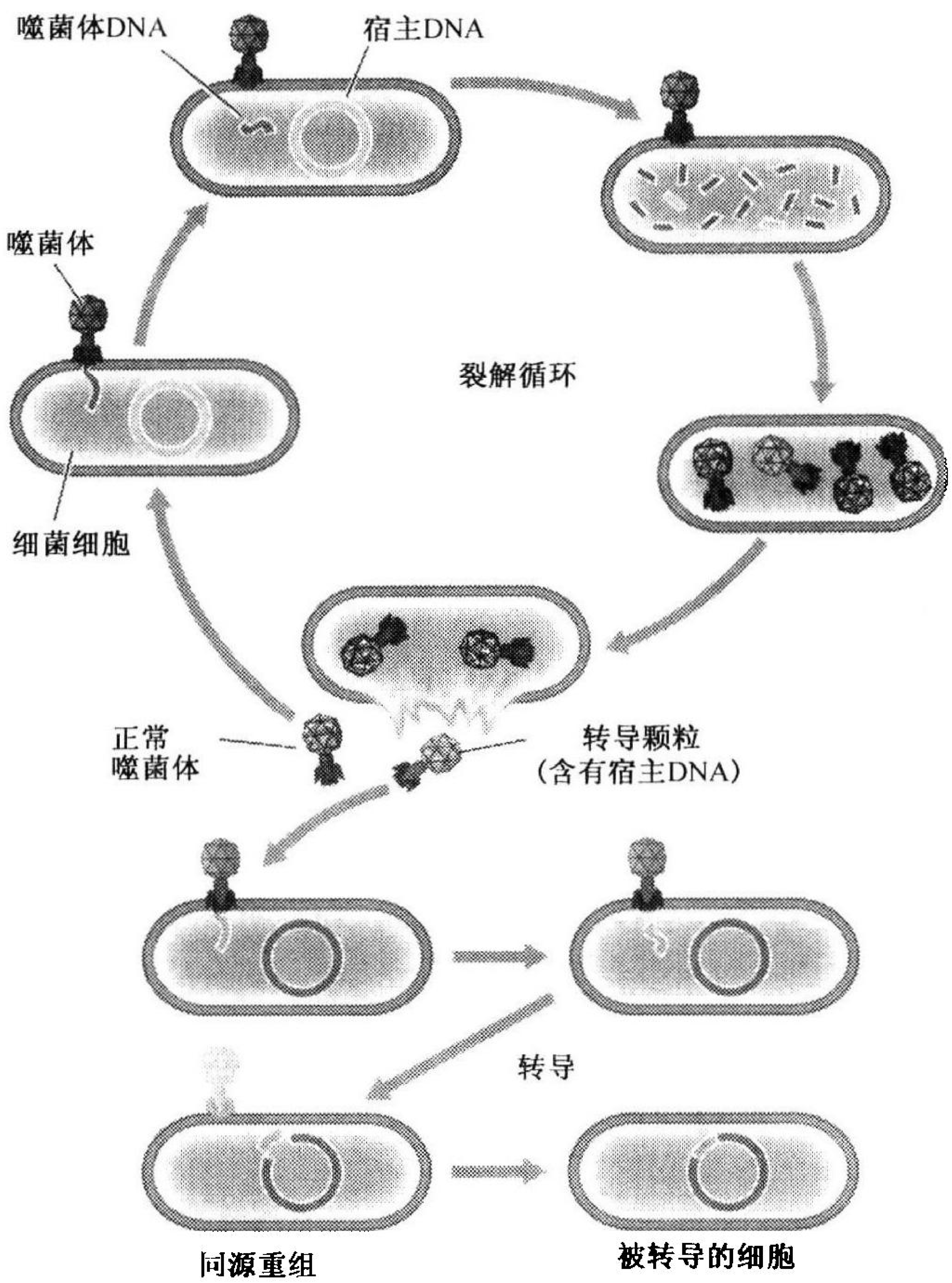


图 10.15 普遍性转导。注意正常病毒粒子含有噬菌体基因，转导颗粒含宿主基因。

能形成转导颗粒的噬菌体既可以是温和性噬菌体也可以是烈性噬菌体，最重要的是都具有错误包装机制，这一机制能够接受宿主 DNA，而且在宿主 DNA 被完全降解前就包装好。当噬菌体对宿主的感染系数很低时，可以明显检测到转导，因为一个细胞仅被一个噬菌体感染。多次感染，细胞将被裂解液中正常的病毒杀死。

λ 噬菌体和特异性转导

由普遍性转导引起的 DNA 从一个细菌转移至另一细菌的频率是很低的。而特异性转导却可以达到相当高的频率，而且允许细菌染色体上的很小区域可以被选择性的转导。我们首先讨论由大肠杆菌温和噬菌体 λ 带来的半乳糖基因的特异转导。

如前所述（见 9.10 节），细胞被 λ 溶原后，噬菌体基因组整合进宿主 DNA 的特异位点，与编码利用半乳糖酶的一组基因相邻（图 9.21）。λDNA 插入宿主 DNA 后，其复制则受宿主染色体的控制。如被诱导，λDNA 则通过整合的逆过程（图 10.16）而脱离宿主 DNA。一般情况下，若诱导溶原化细菌，λDNA 则被切离成一个独立单位。偶尔 λ 基因组会不正确地切离，将邻近的细菌基因（如半乳糖操纵子）切下，同时丢下一部分 λ 基因（图 10.16）。

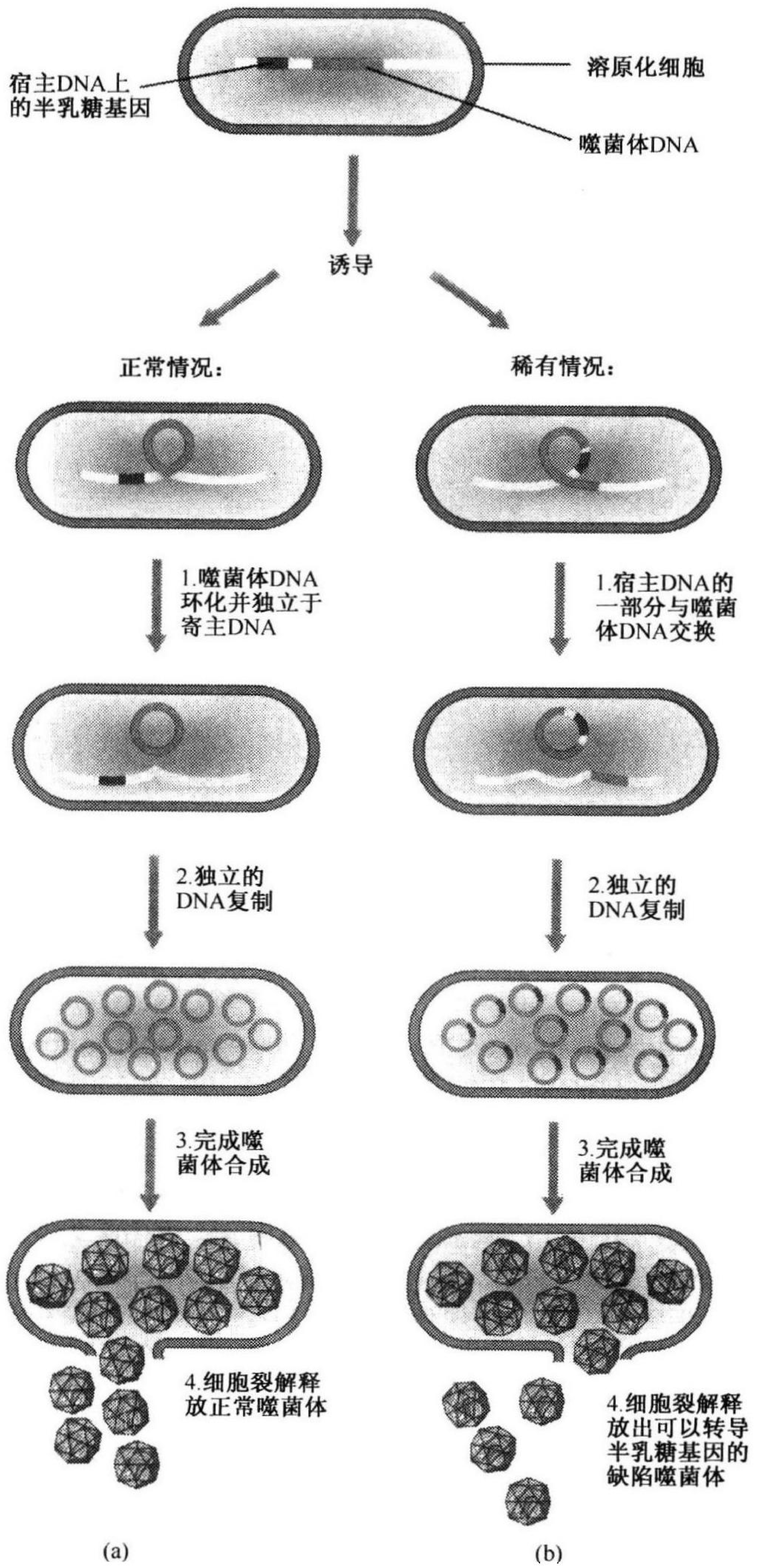


图 10.16 特异性转导。（a）正常裂解情况。（b）噬菌体颗粒将半乳糖基因转导进一个含有 λ 原噬菌体的大肠杆菌细胞后的产物。

一类改变的噬菌体颗粒，称为 λ*dgal*（λ*dgal* 意为“半乳糖缺陷”）。λ*dgal* 是缺陷型，因为缺少一些噬菌体基因。在接下来的感染中不能发育为成熟的噬菌体。而如果有

辅助噬菌体存在时，则可以提供其所缺少的功能，这一辅助噬菌体就是野生型 λ。当细胞被 λ*dgal* 和辅助噬菌体共同感染时，在得到的裂解液中，既有少数的 λ*dgal* 也有大量正常的 λ 噬菌体。用上述裂解液以较高的感染复数感染半乳糖缺陷型细菌（Gal^-），然后选择 Gal^+ 转导子，这些转导子多数为双溶原即同时带有 λ 和 λ*dgal*。当诱导这一双溶原细菌时，裂解液中的 λ 和 λ*dgal* 数量相等，用这一裂解液转导可获得很高的频率，但仅限于转导 *gal* 基因。

如想使 λ 颗粒成活，则由宿主 DNA 所取代的噬菌体数量就有一个限度，因为足够的噬菌体 DNA 需要被保留下来，以合成噬菌体外壳蛋白及裂解和溶原所需的其他蛋白质。如缺陷噬菌体和辅助噬菌体同时感染，即使缺少更多的噬菌体特异基因也可以完成转导。在这种情况下，转导噬菌体颗粒只要有 *att* 区域（吸附位点），*cos* 位点（用于包装的黏性末端）及 λ 基因组的复制起始区，其他均可由辅助噬菌体提供（参见图 9.18 λ 遗传图谱，9.10 节和 9.11 节）。用这种方法已经分离到携带大肠杆菌基因组特异区域的特异性转导噬菌体。另外，可以通过基因工程的技术来构建含有来源于任何生物体基因的 λ 转导噬菌体（见 10.17 节）。

噬菌体的转变

正常的温和噬菌体（非缺陷型）溶原进细胞，其 DNA 转变成原噬菌体状态，这种溶原细胞对相同的噬菌体的再次感染具有免疫性。这种免疫性的获得意味着表型的改变。而在溶原细胞中可检测出其他表型的变化，这些变化似乎与对噬菌体的免疫无关。这种表型的改变是由于正常的温和噬菌体溶原而引起的，故称噬菌体转变（phage conversion）。

目前已对两种噬菌体转变现象进行了深入的研究。一种是噬菌体 ε^{15} 溶原化的鸭沙门氏菌（*Salmonalla anatum*）细胞表面多糖结构的改变；另一种是白喉杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）的无毒株溶原进噬菌体 β（见 26.3 节）后转变成有毒株（致病菌）。在这两种情况下，编码必需分子的基因就是噬菌体基因组的一部分，因此随着噬菌体的感染及溶原化，这些遗传信息也自动的转移进来。

溶原性对宿主细菌有很强的选择意义，因为对同一类型噬菌体的感染有抗性。噬菌体转变在进化上也有一定的意义——可带来宿主遗传上的改变，许多自然分离到的细菌本身就是溶原性的。因此，似乎有理由相信，溶原性是一个正常的情况，对某些宿主的生存来讲是必需的。

概念检查

转导是通过细菌病毒将一个宿主的基因转移至另一宿主。普遍性转导中，缺陷病毒颗粒通过随机包装细菌染色体 DNA 片段，但效率很低。特异性转导是由于温和性噬菌体 DNA 不准确的切离而携带有相邻的宿主基因，这种转导可达到较高的效率。

◆ 普遍性转导与转化有什么重要不同?

◆ 特异性转导中供体 DNA 如果在受体细胞中并未发生重组，却可以复制，但在普遍性转导中却不行，为什么？请解释。

10.9 质粒：一般原理

在讨论第三种基因转移方式——接合（conjugation）之前，我们必须先讨论质粒。质粒（plasmid）是独立于染色体而能自我复制的一类遗传因子（见 7.4 节）。质粒与病毒不同，它不具有胞外形态，而是以游离的、典型的闭合环状 DNA 的形式存在于细胞中。质粒和染色体能够被区分开，质粒携带非必需的基因（但通常是对宿主非常有用的基因），而宿主所必需的基因都在染色体上。我们已了解了上千种不同类型的质粒，仅从大肠杆菌中就分离出了 300 多个不同的自然质粒，本节将讨论几种质粒的特性。

质粒的物理性质和复制

几乎所有已知的质粒均为双链 DNA，多数为环状。也有一些线型的质粒。自然的质粒大小可从 1kb 至 100kb 以上。典型的质粒是环状双链 DNA 分子，约小于染色体的 5%（图 10.17）。从细胞中分离出的大多数质粒 DNA 为超螺旋构型，在细胞中是以一种致密的形式存在（图 7.10）。

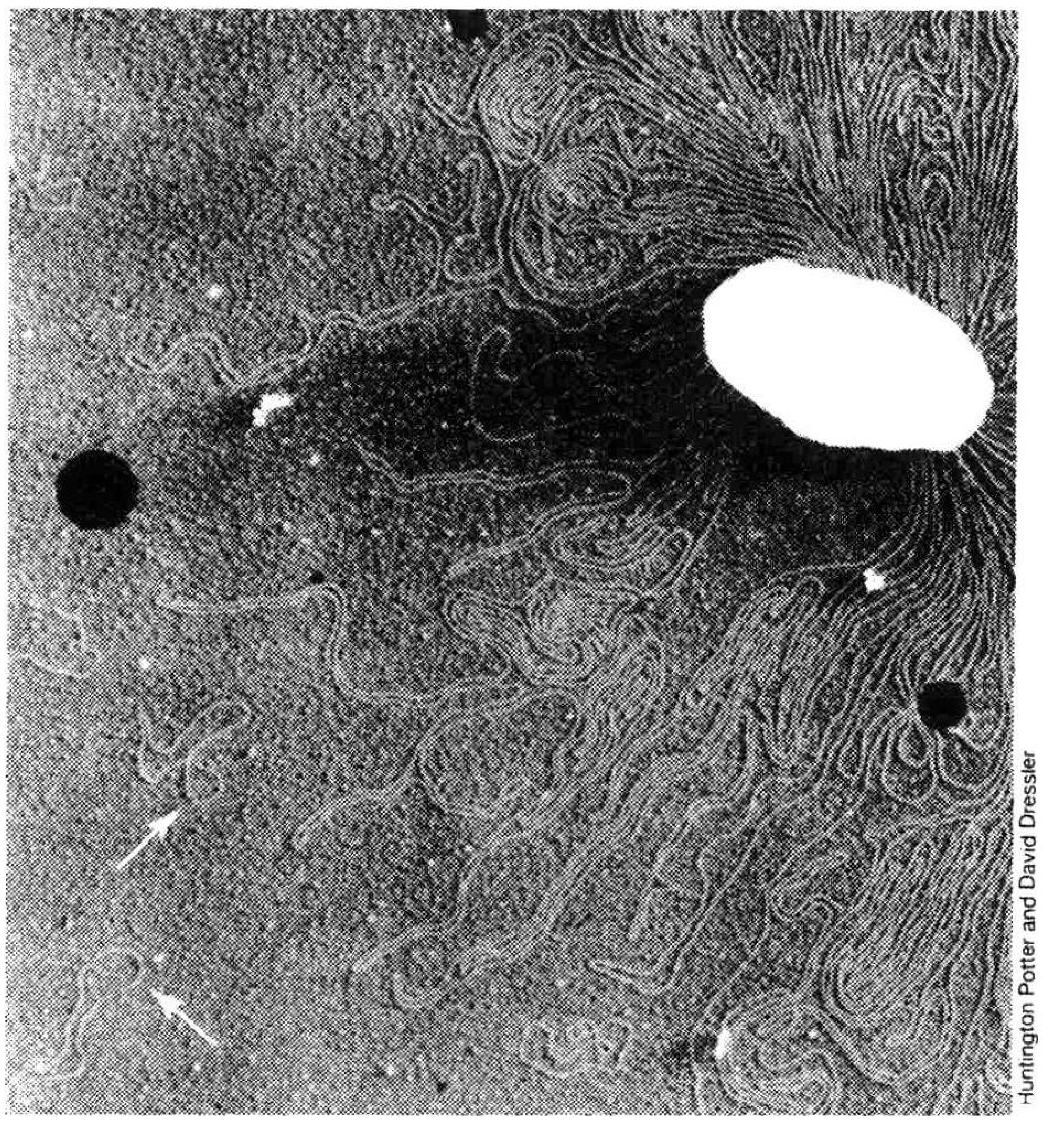


图 10.17 电镜下的细菌染色体和质粒。质粒（箭头所指）为环形结构，比染色体小得多。温和破坏原细胞（大的、白色结构）保持着 DNA 分子的完整。

参与质粒复制的酶均为细胞中正常的酶。质粒本身的基因控制着复制的起始过程，以及将复制后的质粒分配到两个子细胞中。每一细胞中不同质粒的数目是不同的，这就是拷贝数（copy number）。有些质粒在每一细胞中仅有 1～3 个拷贝，而有的可超过 100 个拷贝。拷贝数由质粒基因控制，也受宿主及质粒的相互影响。

革兰氏阴性菌中多数质粒的复制方式与前面叙述过的染色体复制类似（见 7.6 节），包括在复制起始位点开始，围绕环形分子的双向复制（bidirectional replication），出现

“θ” 形中间体等（图 7.17）。也有些质粒是单向复制（unidirectional replication）。质粒 DNA 相对于染色体是很小的分子，全部复制过程很快就完成了，所用时间仅为整个细胞分裂周期的 1/10，甚至更短。

革兰氏阳性菌中多数质粒的复制是通过滚环机制，类似噬菌体 ΦX174（见 16.2 节和图 16.4），这种复制机制会形成单链的中间体，因此这些质粒有时就是单链 DNA 质粒。多数线性质粒的复制机制是以一种蛋白质结合在双链的 5′端，从而引导 DNA 的合成（见 14.6 节）。

质粒不相容性和质粒消除

有些细菌可含有几种不同类型的质粒，如 *Borrelia burgdorferi*（莱姆关节炎的病原菌，见 27.4 节）含有 17 种不同的环形和线性质粒。同一细胞中两个不同质粒的复制受控于调节 DNA 复制的质粒基因。当一个质粒转移进带有另一质粒的细胞时，普遍的现象是第二种质粒不能在细胞中保存下来，在下一次细胞分裂时就会丢掉。如果发生了这种情况，这两种质粒间称为不相容（incompatible）。已鉴定出许多质粒的不相容群（Inc）。在同一细胞中，属于同一不相容群的质粒相互排斥，但可以与另一不相容群的质粒共存。同一不相容群的质粒拥有共同的复制调节机制，因此彼此之间有一些共同的特性。一个细菌可以含有不同种类的质粒，它们之间在遗传上是不同的。

一些质粒称为附加体（episome），可以整合进染色体，其复制便受染色体的控制，此特征最明显的是几种病毒，其基因组可与宿主基因组合成一体（原噬菌体，见 9.10、16.5、16.11 和 16.15 节）。有时利用多种方法处理宿主细胞会消除质粒，这一过程也称为消除（curing）。消除时质粒复制受抑制但并不影响染色体的复制，因此随着细胞分裂，质粒便丢失了。这一消除作用可自发产生，但若用一些化学物质如吖啶染料（它可以插入 DNA 分子）处理可以大大提高消除率。其他方法处理也能影响质粒的复制而不影响染色体。

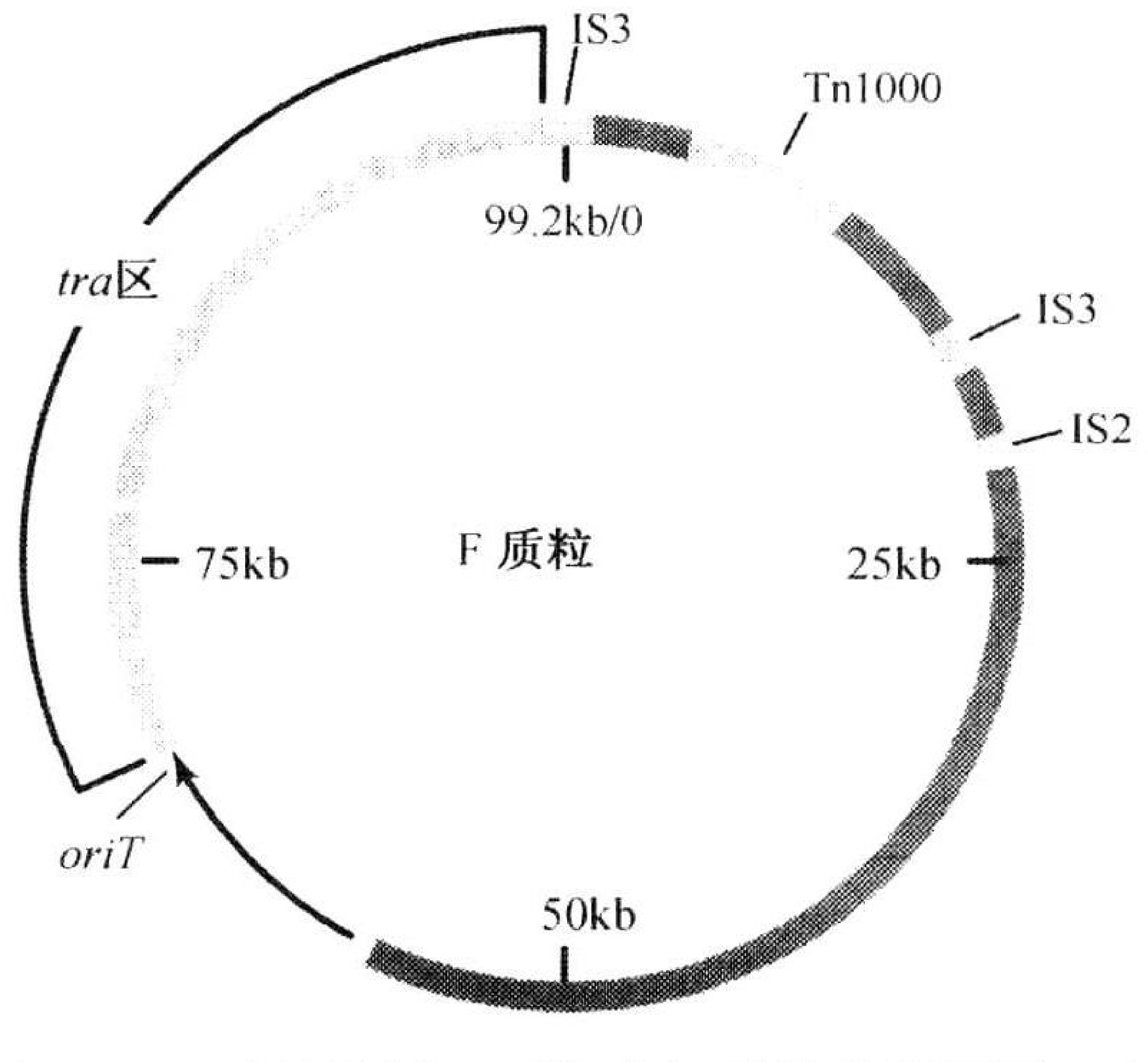


图 10.18 大肠杆菌 F（致育）质粒的基因图。内圈的数字单位为 kb，表示质粒的大小（确切的大小是 99 159bp）。图底部的深绿色区域含有的基因主要负责 F 质粒在生长细胞中的复制和分离。淡绿色区域——*tra* 区域含有的基因具有结合转移功能。*oriT* 是转移起始区。箭头表示转移的方向（最后转移 *tra* 区域）。黄色区域表示转座因子，通过这些部位可以整合进细菌染色体上相同的区域形成各种 Hfr 菌株（见 10.12 节）。

我们以研究的很清楚的一个大肠杆菌质粒——F 质粒（F plasmid）为例看一下质粒的特性。F 质粒（F 代表致育性）是一个环形的 DNA 分子，99 159bp长，用吖啶橙能很容易的从细胞中消除掉。图 10.18 是 F 质粒的遗传图，它含有调节 DNA 复制的区域，还含有多个转座因子（见 10.14 节），有助于实现附加体的功能。另外还有一个很大的、称为 *tra* 的区域，此区域的基

因可使 F 质粒从一个细胞转移至另一细胞（见后述内容）。

细胞间的质粒转移

由于质粒不具备胞外形式的特征，我们设想它只能在细胞分裂时被转移。另外，某些原核生物细胞能从环境中吸收游离的 DNA（见 10.6 节），若将宿主裂解，就有可能使质粒接触新宿主。然而这一过程仅在个别细胞中自然发生，并不是细胞间的质粒转移。细胞间质粒转移的机制称为接合（conjugation），这一功能是由某些质粒自身所编码的。接合是复制的过程，最终两个细胞都具有同一个质粒拷贝（图 10.19）。

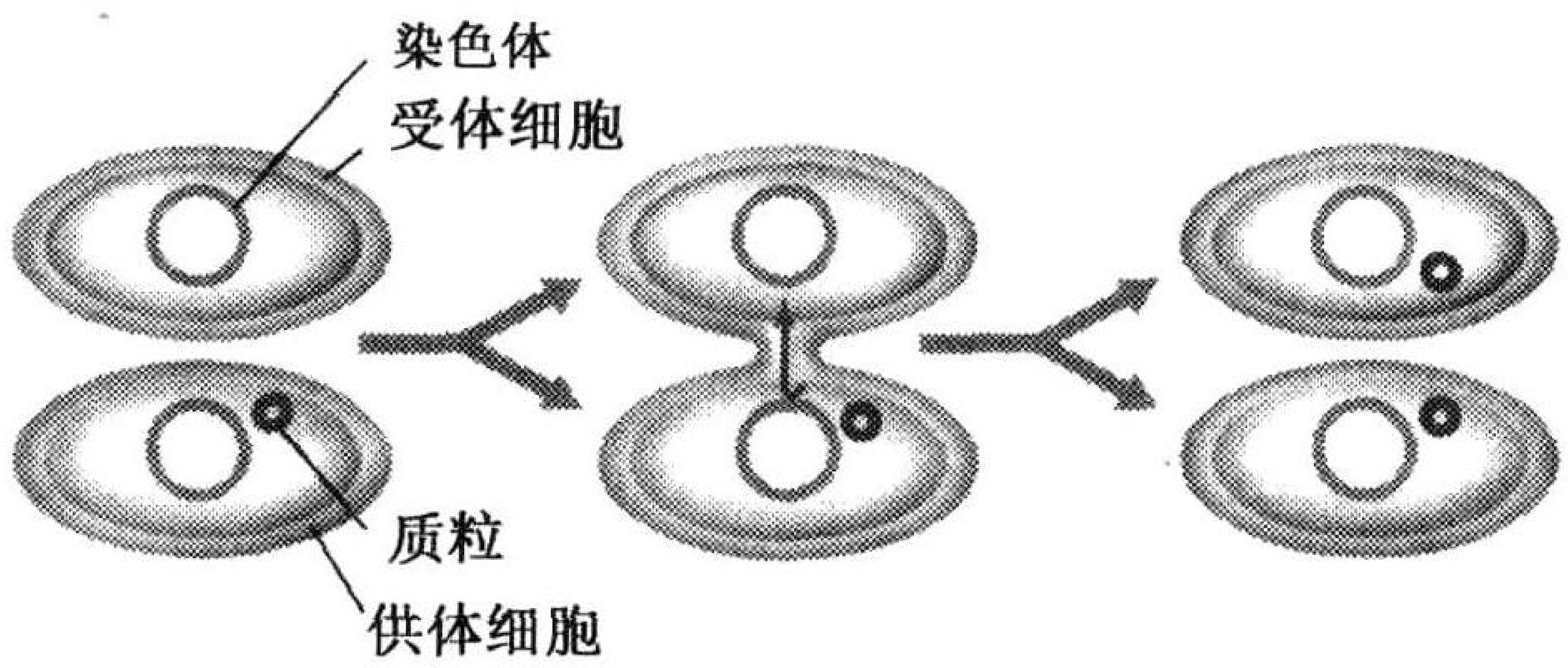


图 10.19 接合过程中细胞间的质粒转移。在原核生物的基因转移过程中，DNA 的转移是单向的。

细胞接触时能转移的质粒称为可接合质粒，但并非所有的质粒都是可接合的。决定接合转移能力的是质粒上的一组称为 *tra*（代表 transfer）区的基因。*tra* 区基因编码的蛋白质，一些在 DNA 的转移和复制中起作用，其他的在细胞接合配对中起作用。如果质粒整合进染色体，*tra* 区还有一个重要的作用就是可以带动染色体从一个细胞转移至另一个细胞。利用接合方式转移宿主基因的内容将在下一节讨论。

假单胞菌属（*Pseudomonas*）中有些接合质粒具有广泛的宿主范围，这意味着它们可转移到多种革兰氏阴性菌中。还有些质粒可以在远缘生物中转移遗传信息。已发现这种质粒可以在革兰氏阳性与革兰氏阴性菌间转移；还可以在细菌与植物细胞之间，细菌与真菌之间转移。即使质粒在新的宿主中不能独立复制，但质粒本身的转移就有重要的进化意义，因为质粒的某些基因有可能与新宿主的基因组重组。

概念检查

质粒是携带各种非必需基因的小的环型或线型 DNA 分子。尽管一个细胞可以含有不止一个质粒，它们在遗传上是不相关联的。质粒在接合过程中可以通过单向转移的方式被转移。

◆ 一个大质粒怎样与一个小染色体区分开？

◆ F 质粒的 *tra* 基因有什么作用？

10.10 质粒的种类及其生物学意义

很明显，所有的质粒都必须带有保证自身复制的基因。我们已知道一些质粒还带有

接合所需的基因，这些基因可通过生物学方法检出，如质粒转移特性以及对某些病毒的敏感性（见 16.1 节）。

尽管质粒上并不携带宿主所必需的基因，但质粒携带的基因对细胞的表型有着极大的影响。某些情况下质粒所带有的特性，就是这一细菌的生存状态。例如，根瘤菌属（*Rhizobium*）能与植物相互作用，形成固氮根瘤的能力就需要特定质粒的作用（见 19.22 节）。其他的质粒已证明赋予细胞特殊的代谢特性，如对有毒污染物的降解。事实上，质粒不仅赋予细胞一些特殊的功能，而且在很多情况下能够通过基因的水平流动来转移这些功能。质粒唯一不带的基因就是影响本身复制及宿主生存的基因。表 10.3 中总结了质粒赋予原核生物的几种表型特征。

表 10.3　质粒赋予原核生物的几种表型特征

表形分类[a]	生物[b]
产抗生素	链霉菌属（*Streptomyces*）
接合	埃希氏菌属（*Escherichia*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、根瘤菌属（*Rhizobium*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、链球菌属（*Streptococcus*）、硫化叶菌属（*Sulfolobus*）、弧菌属（*Vibrio*）
生理功能	
降解辛烷、樟脑、萘	假单胞菌（*Pseudomonas*）
降解除草剂	产碱菌属（*Alcaligenes*）
形成丙酮和丁醇（见 10.20 节）	梭菌属（*Clostridium*）
利用乳糖、蔗糖、尿素，固氮	肠道细菌（Enteric bacteria）
生根瘤及共生固氮（见 19.22 节）	根瘤菌属（*Rhizobium*）
产生色素	欧文氏菌（*Erwinia*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）
抗性	
抗生素抗性（见 20.12 节）	弯曲杆菌属（*Campylobacter*）、肠道细菌（Enteric bacteria）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）
抗汞、镉、镍、钴、锌、砷（见 19.16 节）	酸胞菌属（*Acidocella*）、产碱菌属（*Alcaligenes*）、李斯特氏菌属（*Listeria*）假单胞菌属（*Pseudomonas*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）
细菌素抗性（及产生）	芽孢杆菌属（*Bacillus*）、肠道细菌（Enteric bacteria）、乳球菌属（*Lactococcus*），丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）
毒力	
侵害宿主细胞	沙门氏菌属（*Salmonella*）、志贺氏菌属（*Shigella*）、耶森氏菌（*Yersinia*）
凝固酶、溶血素、肠毒素（见 21.9 节和 21.11 节）	葡萄球菌（*Staphylococcus*）
肠毒素、K 抗原（见 12.11 节和 21.11 节）	埃希氏菌属（*Escherichia*）
对植物的致瘤性（见 19.21 节）	农杆菌属（*Agrobacterium*）

a. 只列出与质粒有关的少数表型；

b. 只列出几个熟知的例子，所有生物都是细菌，仅嗜硫菌硫化叶菌属（*Sulfolobus*）为古生菌。

抗性质粒

在分布最广泛的质粒中研究得最清楚的是抗性质粒（resistance plasmid）（R 质粒）。它们对抗生素及其他生长抑制因子表现出抗性。日本首先从肠道细菌中发现了 R 质粒，带有质粒的细菌对许多抗生素均表现抗性（多抗），随后在世界各地陆续发现。细菌能抗多种抗生素的危险性具有重要的医学意义，因为在处理感染性疾病时就要加大抗生素的用量。不久便分离出这种抗性菌株，并证明当它与敏感菌接触时，能将抗性转移给后者。由于可接合的 R 质粒的感染使得这一特性在细菌群体中得以迅速扩展。目前抗性质粒是临床医学上的一个主要的问题（见 20.12 节）。

R 质粒可带有多种抗生素基因。一般情况下抗性基因编码的蛋白质，有的使抗生素失活，有的影响抗生素进入细胞。质粒 R100，大小为 94.3kb（图 10.20），所带的抗性基因包括磺胺、链霉素、壮观霉素、梭链孢酸、氯霉素和四环素。除此之外 R100 还带有与抗汞有关的基因（见 19.16 节）。质粒 R100 可以在肠道细菌的几个属中转移，包括埃希氏菌属（*Escherichia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、变形杆菌属（*Proteus*）、沙门氏杆菌属（*Salmonella*）和志贺氏菌属（*Shigella*），但不能转移进非肠道细菌的假单胞菌属（*Pseudomonas*）。不同的 R 质粒带有抗生素抗性基因大多是已知的。许多 R 质粒上的抗性因子，如 R100 等，同时也是转座因子（见 10.14 节）。加之许多 R 质粒都可以进行接合转移，这两方面使得 R 质粒对传统的抗生素治疗构成了威胁。

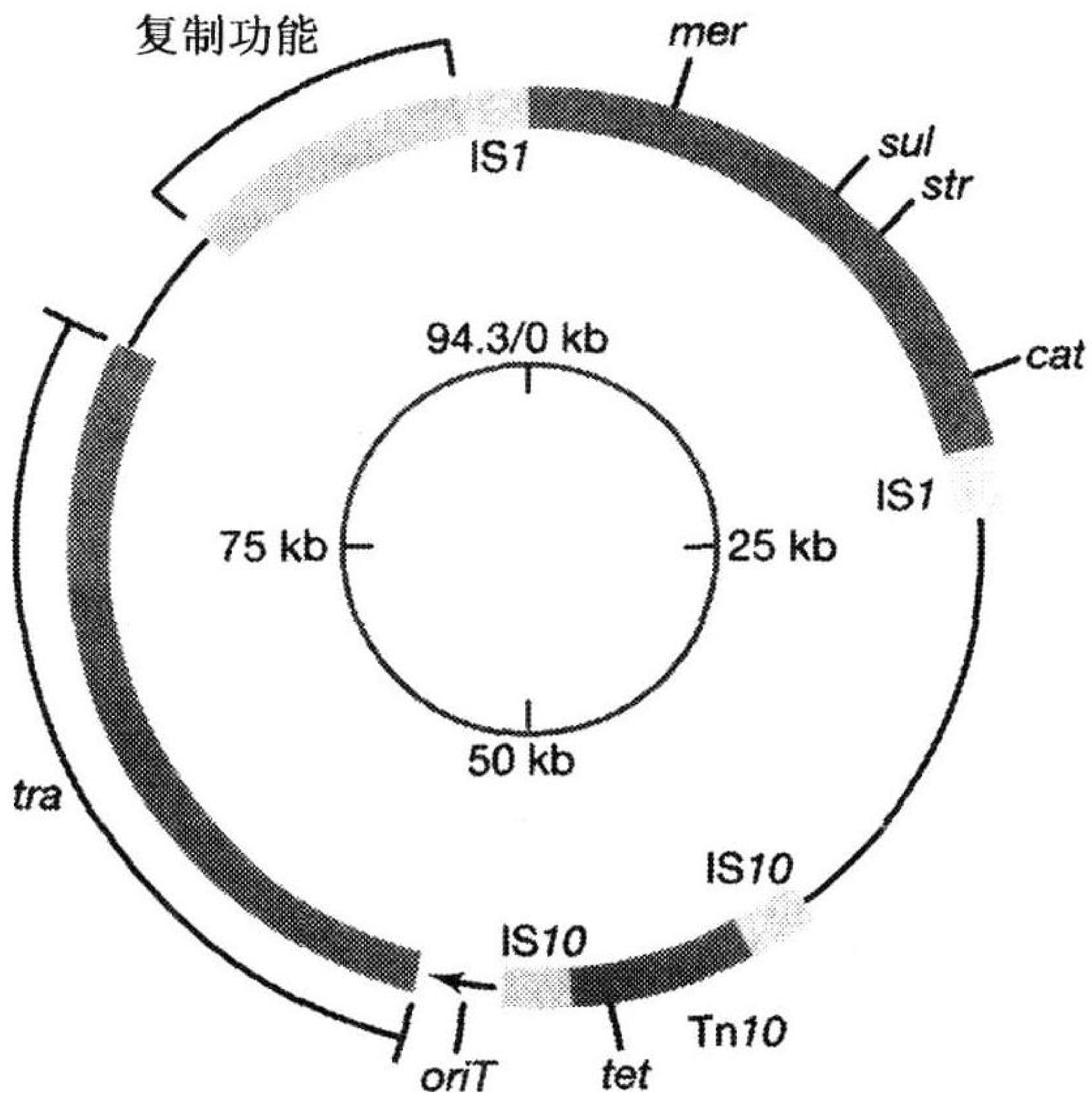


图 10.20 抗性质粒 R100 的遗传图。内环表示质粒的大小，单位是 kb。外环表示抗生素抗性基因位置以及主要功能：*cat* 为氯霉素抗性；*oriT* 是接合转移位点；*mer* 为汞离子抗性；*sul* 为磺胺抗性；*str* 为链霉素抗性；*tet* 是四环素抗性；*tra* 表示与转移有关的基因；IS 表示插入序列；Tn*10* 是转座子。89～92kb 区域是与质粒复制有关的基因。

编码毒素的质粒和其他毒力特征

我们将在第 21 章中讨论病原微生物是如何侵入宿主引起感染的特性。在此我们只

需注意两个有关病原毒力方面的特征（致病能力）：①病原菌吸附及侵入寄主特异的组织；②形成危害寄主的物质（毒素、酶及其他分子）。

几种病原菌的每一种毒性特征均由质粒所编码。如肠道致病菌大肠杆菌可侵入小肠产生一种毒素导致腹泻症（见 21.1 节）。细胞表面有一种蛋白质，称为入侵因子抗原（colonization factor antigen），也是由质粒编码的。这一蛋白质可使细菌细胞吸附到肠道上皮细胞。已知致病的大肠杆菌至少有两种毒素均由质粒编码：裂解血细胞的溶血素（hemolysin）和肠毒素（enterotoxin），后者可导致体内的水和盐大量分泌到肠道中，这便是将在第 21 章要讨论的由肠毒素引起的腹泻症。

许多毒素因子是由质粒编码的，也有一些是由转座子和噬菌体等可动遗传因子（mobile genetic element）编码的，当然也有一些是由染色体编码的。我们已经知道了许多关于毒素基因存在于不同的遗传因子上的例子。例如，产志贺氏菌毒素（shigatoxin）的大肠杆菌中编码毒力决定子的基因分布在染色体、噬菌体和质粒上。

细菌素

许多细菌可产生一种蛋白质，能够抑制甚至杀死密切相关种类的细胞或者同种的不同菌株，这些物质被称为细菌素（bacteriocin），其抗生谱较窄不同于抗生素。编码细菌素和参与加工运输的蛋白质（赋予产生菌免疫性）的基因通常都在质粒或转座子上。细菌素的命名依据产生的细菌种类，如大肠杆菌产生的，称之为大肠杆菌素（colicin），由 Col 质粒编码；枯草杆菌产生的，称为枯草芽孢杆菌素（subtilisin）等。

大肠杆菌 Col 质粒编码多种大肠杆菌素。此毒素从产生的细胞中分泌出来，结合到敏感细胞表面的特异受体上。毒素受体通常都是具有功能的实体，其主要功能是转移生长因子或微量营养物质通过细胞的外膜（脂多糖层）。大肠杆菌素可破坏一些关键细胞的功能而杀死细胞。许多毒素能在细胞膜上形成通道，使钾离子和质子排出细胞，导致细胞丧失能量形成的功能。大肠杆菌素 E2 是一种 DNA 内切酶，可用于切割细胞 DNA，而 E3 是另一种核酸酶，可切割 16S rRNA 的特异性位点，使核糖体失活。Col 质粒有些具有接合性有些不具有接合性。

革兰氏阳性菌的细菌素或类似物与大肠杆菌素完全不同，但也是由质粒编码。有些毒素具有一定的经济价值，如由乳酸菌产生的杆菌素——乳链菌肽 A（nisin A）对广泛分布的革兰氏阳性菌的生长有很强的抑制作用，因此常用于食品工业中作为防腐剂。

工程质粒

在本章后面的部分我们将介绍基因工程的基本工具，使在实验室中构建出新型、无数量限制的人工质粒成为可能。将广泛来源的基因结合进人工质粒，可以不受任何生物种类的障碍而转移遗传物质，甚至还有可能合成一个新的基因引入质粒。人工质粒的要求有以下几点：①含有能够控制自身复制的基因；②如果需要接合，则含有转移功能（*tra*）；③能够在宿主中稳定的保存。

我们现在将注意力转移到有关接合的细节上，看一下质粒是如何驱动细菌染色体从供体向受体转移的。

概念检查

质粒所携带的遗传信息，在大多数条件下对细胞的功能是非必需的，但在一定条件下它具有选择生长优势。如抗生素抗性，是由于产生的酶能降解不常用的有机物以及具有特殊的代谢途径。许多病原菌的毒素因子通常是由质粒编码的。

◆ R 质粒与 F 质粒有什么不同？它们又有什么相同点？

◆ 细菌素与抗生素有什么不同？

10.11 接合：基本特征

细菌接合（bacterial conjugation）是指细胞与细胞接触时基因转移的过程（见 10.9 节）。如前所述，接合是一种由质粒编码的机制，利用这一机制，可接合性质粒将自身的一个拷贝转移至新宿主。然而在接合过程中，其他的遗传因子，包括细胞里的另一些质粒及宿主染色体，有时也能发生转移。事实上接合现象的发现就是因为大肠杆菌（图 10.17）的 F 质粒带动了寄主染色体的转移。接合转移的机制不完全相同，主要取决于参与转移的质粒。但大多数革兰氏阴性菌质粒转移的机制看上去与 F 质粒类似。

接合过程涉及含有特殊的可接合质粒的供体细胞，以及不含这一质粒的受体细胞。控制接合的基因都位于质粒的 *tra* 区域（见 10.9 节）。*tra* 区域的许多基因与细胞的接合对形成有关，大多数基因负责合成细胞外的一种表面结构即性毛（sex pilus）（图 10.21）。只有供体细胞具有性毛。不同的可接合质粒其 *tra* 区域可稍有差异，性毛也不完全相同。F 质粒编码相应的 F 性毛（F pili）。

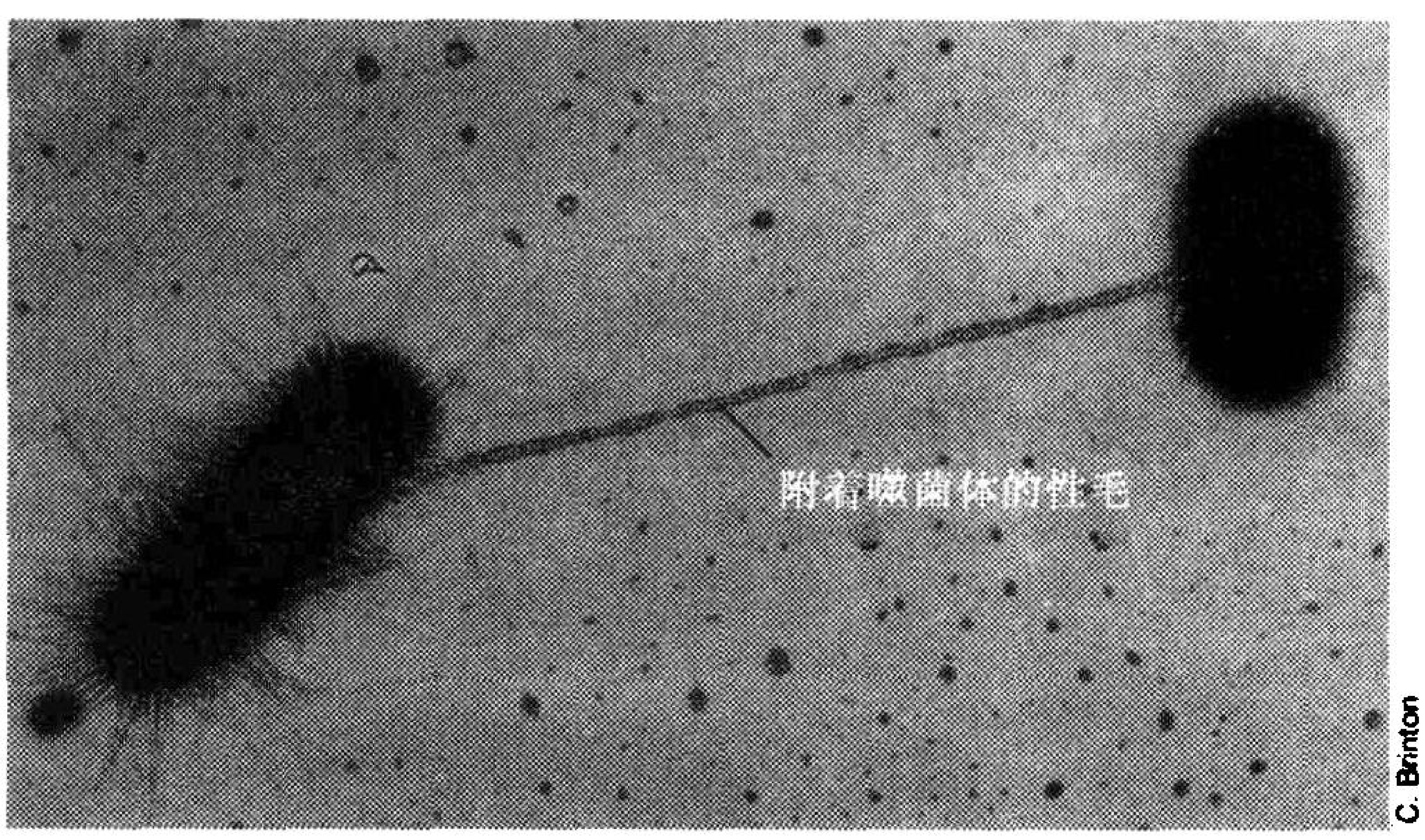


图 10.21 两个接合的细菌利用性毛直接接触。随后两个细胞拉到一起形成接合对，发生 DNA 转移。这个过程需要供体细胞纤毛的收缩（非聚合作用）来完成。注意在性毛上有 F 专一噬菌体（见 16.1 节）。

性毛促使供体和受体细胞特异地配对，全部革兰氏阴性菌的接合都依靠由性毛引起的细胞配对。性毛可与受体细胞上的特异接受位点接触，然后通过收缩性毛将两个细胞拉到一起。供体细胞与受体细胞之间的接触很稳定，有可能细胞外膜发生融合，DNA

就从一个细胞转移至另一细胞。

接合过程中 DNA 转移机制

在接合过程中 DNA 转移时，DNA 的合成是必需的。在某些噬菌体中有一种合成 DNA 机制称为滚环复制（rolling circle replication）（见 9.11 节）。这一机制也是对接合中 DNA 转移的最好解释，图 10.22 概述了这一过程。接合过程是由于细胞与细胞的接触而引发，同时质粒环形 DNA 分子的一条链形成切口，这条链便可转移进受体菌。这个过程需要切口酶 Tra Ⅰ 来起始，Tra Ⅰ 这种酶由 F 质粒的 *tra* 操纵子编码，它具有解旋酶活性，因此被转移的那条链能够被解开。在转移的同时供体细胞通过滚环合成新的 DNA 分子替代转移的一条链，在受体细胞中互补 DNA 链也很快形成。因此在转移过程结束时供体和受体中均有完整的质粒。例如，F 质粒的转移，含有 F 质粒的细胞——F^+，能够与不含 F 质粒的细胞——F^- 配对，结果产生两个 F^+ 细胞（图 10.22）。

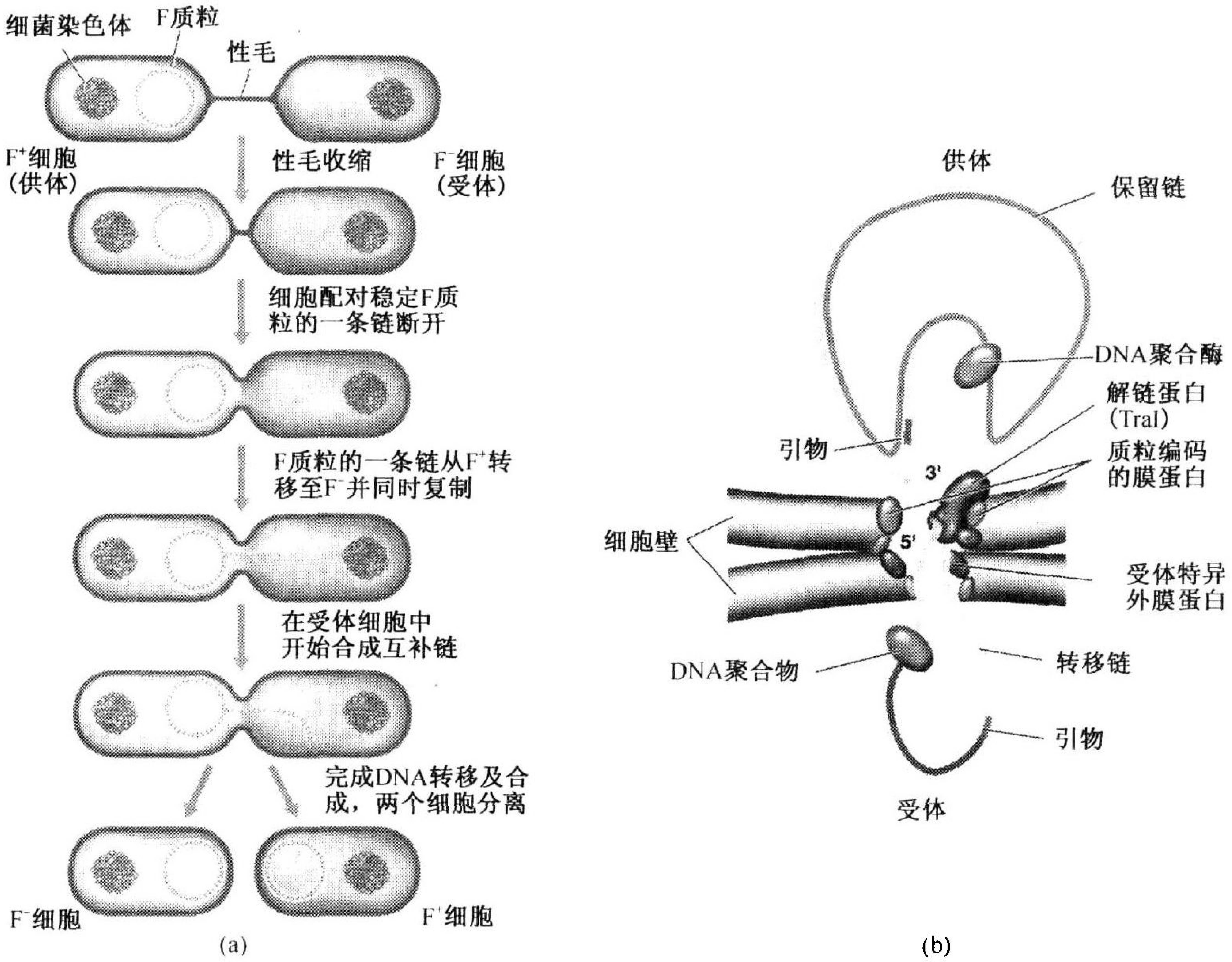


图 10.22 质粒 DNA 在接合过程中的转移。（a）F^+ 细胞的 F 质粒转移到 F^- 受体细胞，注意滚环复制的机制（图 9.20 和图 16.4）。（b）复制及转移过程的细节。

质粒 DNA 有很高的转移效率，在合适的条件下每个受体细胞在配对时都会获得质粒。当质粒基因在受体细胞中表达时，受体细胞本身也变成了一个供体，并且可以把质粒转移到其他的受体细胞。在这种情况下，质粒就像感染因子一样可以在细胞间快速地传播。质粒转移的感染特性具有重要的生态学意义，当一些含有质粒的细胞与受体菌中的一些适合的个体接触时，若赋予其选择优势的基因，就会在很短的时间内整个受体群

体都会含有质粒。质粒也会通过一个叫做消除的过程而丢失，当在没有保存质粒的选择压力下，这个过程可以自发地发生。例如，在细胞生长的环境中没有抗生素影响细胞的生存，那么具有抗生素抗性的质粒就会丢失掉。

概念检查

接合是原核生物中 DNA 转移的机制，它要求细胞与细胞之间的接触。控制细胞接合的基因及使质粒由供体细胞进入受体细胞的基因都是由质粒携带的（如 F 质粒）。质粒 DNA 的转移过程也通过滚环机制复制。

◆ 在接合过程中，供体细胞与受体细胞是怎样彼此联系的？

◆ DNA 的滚环复制与 7.5 节和 7.6 节描述的染色体 DNA 复制过程有什么不同？

10.12 Hfr 菌株的形成及染色体移动

到目前为止讲到的接合内容中尚未涉及染色体基因的转移。然而大肠杆菌的 F 质粒（见 10.9 节）在细胞与细胞接触时可以转移染色体基因。F 质粒是一种附加体，即质粒可以整合进宿主染色体（见 10.9 节）。F 质粒整合后，就会带动染色体基因的转移，使供体和受体之间通过侧向基因转移机制进行广泛的遗传重组。

带有非整合态 F 质粒的细胞称为 F^+。F 质粒已整合进染色体的细胞称为 Hfr，（high frequency of recombination，即高频重组）。F^+ 和 Hfr 细胞都是供体细胞，它们都不能再接受第二个 F 质粒或其他的相关质粒。与 F^+ 和 F^- 之间的接合不同，F^- 和 Hfr 的接合会引起染色体基因的转移，因为质粒已是染色体的一部分。接下来在受体细胞中会发生基因重组，重组基因的表达会使 F^- 受体细胞出现新的表型。因此质粒的整合是一种细胞遗传因素转移的机制。高频重组是指供体与受体的染色体基因之间有很高的重组频率。

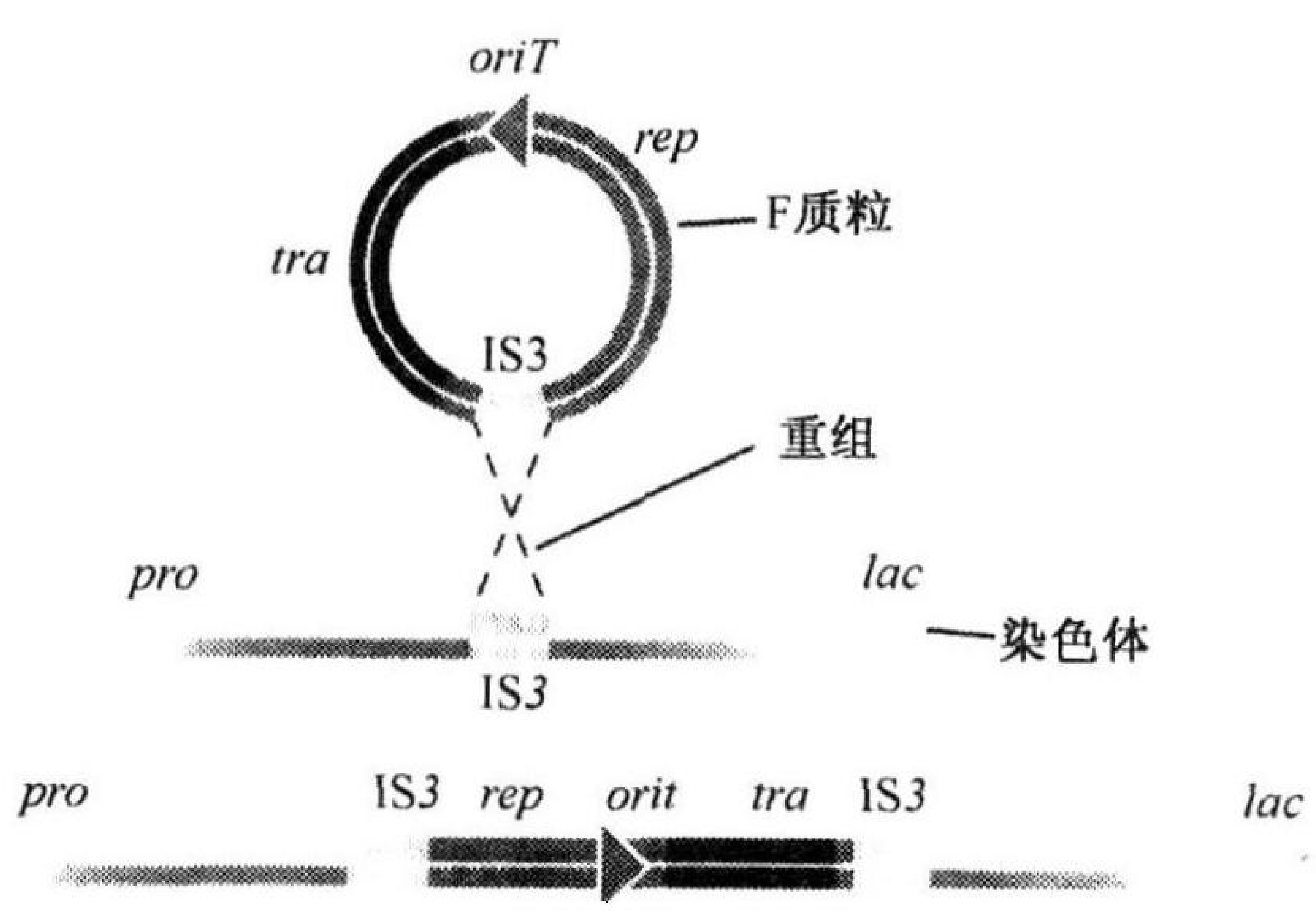


图 10.23 F 质粒整合进染色体形成 Hfr。 F 质粒可插入许多特异位点，这些位点都是 IS。图中所示的插入位点是 IS3，位于染色体基因 *pro* 和 *lac* 之间。图中列出了 F 质粒上的一些基因。箭头表示转移起点 *oriT*，紧邻箭头的基因为转移序列的结尾。因此这一 Hfr 菌株转移染色体的第一个基因是 *pro*，而 *lac* 是最后一个基因（图 10.24）。

F 质粒的存在使受体细胞在 3 个方面有了明显的改变：①具有 F 纤毛的合成能力；②DNA 可转移到另一细胞；③细胞表面的受体发生改变，不再作为接合过程的受体。

F 质粒的整合和染色体的移动

寄主染色体上有许多特异位点可供 F 质粒整合，这些位点称为 IS（即插入序列）位点是染色体与质粒 DNA 之间的同源序列（见 10.13 节关于插入序列的讨论）。图 10.23 显示了 F 质粒在 IS 位点的整合。一旦发生整合，质粒的复

制将不再受自身的控制，但是 *tra* 操纵子仍然有功能使菌株合成纤毛。当遇到受体细胞时，会引发 F^{+} 细胞的接合作用，并且从 *oriT*（转移起点）处起始 DNA 的转移。然而质粒若已经成为染色体的一部分，随着质粒 DNA 的部分转移，染色体基因也开始转移（图 10.24）。就像在接合过程中只转移 F 质粒一样（图 10.22），染色体 DNA 的转移过程也会发生复制。因此，在转移之后，Hfr 菌株仍然是 Hfr 菌株，因为细胞中保留了一份被转移基因的拷贝。

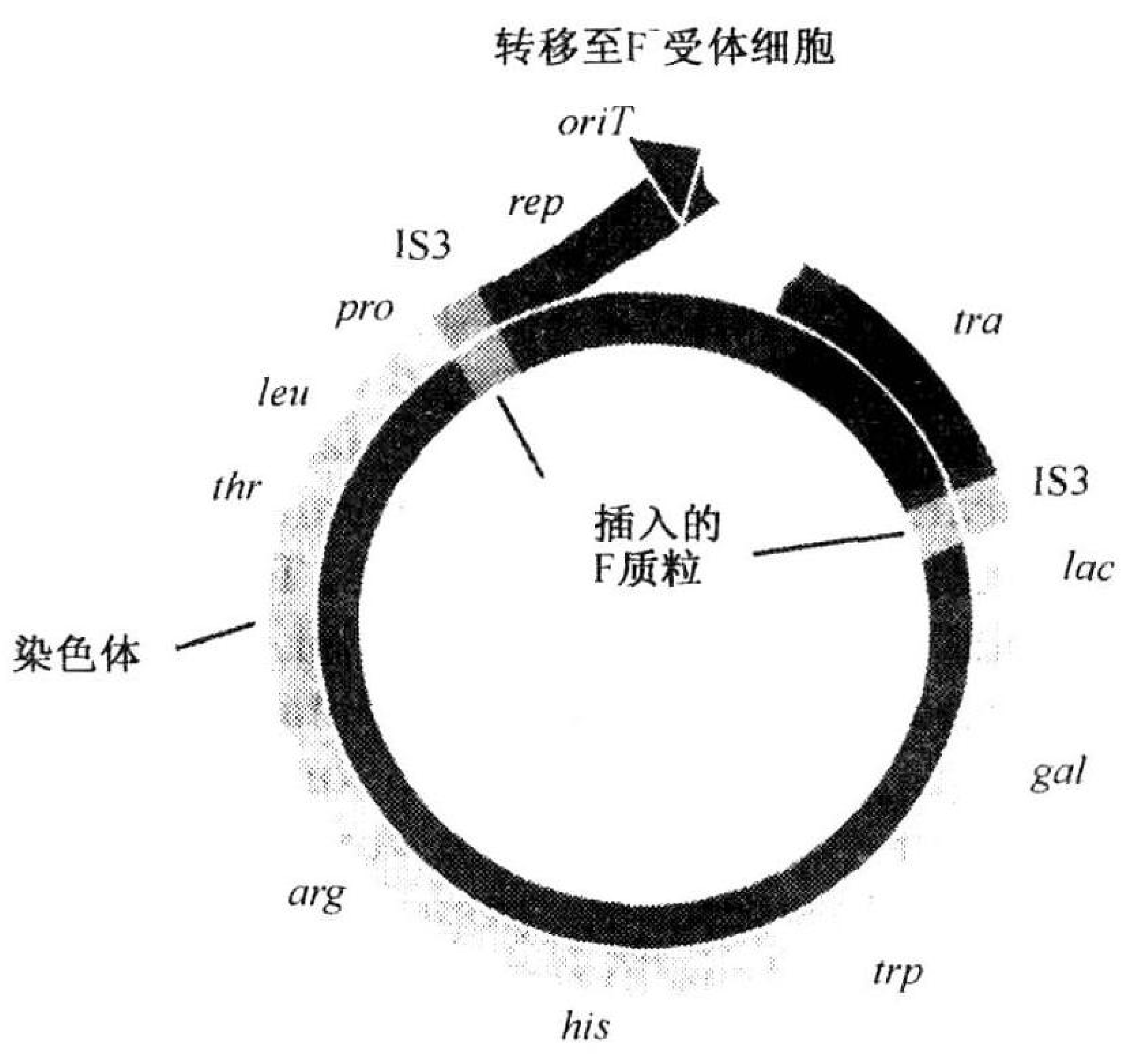


图 10.24　Hfr 染色体在转移起点断裂，DNA 开始转移进受体。复制发生在转移过程中（图 10.22）。图中未标比例数字，事实上插入的 F 质粒小于大肠杆菌染色体的 3%。

由于在染色体上有多个不同的插入位点，因此能形成多种不同的 Hfr 菌株。得到的一个 Hfr 菌株，它在转移基因时，总是以同一顺序从同一位点开始，然而，F 质粒在不同位点整合进染色体所形成的 Hfr 菌株，会以不同的顺序转移基因（图 10.25）。在通常的转移过程中，由于 DNA 链会随时断开，因此只有供体染

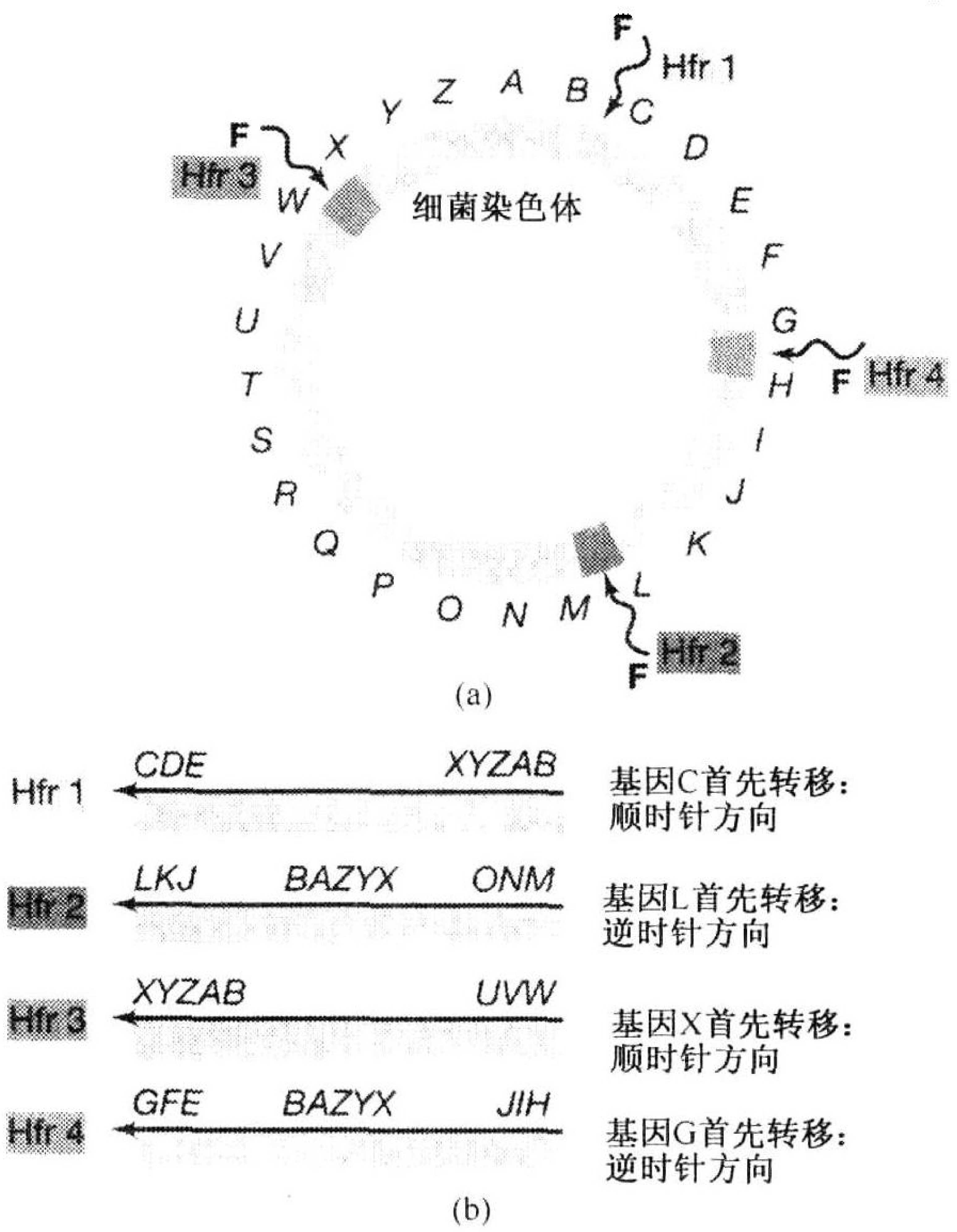


图 10.25　不同 Hfr 菌株的形成方式，这些菌株从不同的起点以不同的顺序转移基因。细菌染色体（a）在各种不同的插入序列处断开，然后 F 质粒插入到这些序列中间。基因的顺序在（b）部分中列出。

色体的一部分能转移成功。受体细胞得到的这一染色体片段也不能复制。一般情况下供体基因是检测不到的，除非它与受体染色体重组，受体染色体又接受了这一片段。尽管 Hfr 菌株能以很高的频率转移染色体基因，但通常 F^- 细胞不会变为 F^+ 或 Hfr，因为全部 F 质粒转移是很稀少的。当 Hfr 菌株与 F^- 菌株杂交时会得到原来的 Hfr 菌株和具有新的基因型和表型的 F^- 菌株。同转化和转导过程一样，Hfr 与 F^- 基因间的遗传重组是发生在受体细胞中的同源重组。

在插入位点上，F 质粒能够以起点的一个方向整合，也能够以起点的另一相反方向整合，其整合方向决定染色体上的哪一个基因首先转移进受体（图 10.25）。在大肠杆菌某一菌株染色体被测序之前，利用各种 Hfr 菌株的杂交实验，可确定其染色体上全部基因的排列顺序及其方向（图 10.42）。

Hfr 菌株在遗传杂交中的应用

与任何细菌基因转移系统一样，从接合的菌株中也要挑选重组子。然而与转化和转导不同的是，接合过程中供体与受体细胞都是活细胞。因此合适的选择培养基很重要，能使重组子生长而任何亲本菌株则不能。受体通常为抗生素抗性和某种物质的营养缺陷型，供体为抗生素敏感和原养型。因此在含有抗生素的基本培养基上只有发生了接合的受体细胞才可以生长。

例如，图 10.26 所示的实验，Hfr 供体对链霉素敏感（Str^s），但它能合成苏氨酸和亮氨酸（Thr^+ 和 Leu^+），并可以利用乳糖（Lac^+），与它交配的受体细胞不能够产生这些氨基酸，但是具有链霉素抗性（Str^r）。所用的选择培养基是基本培养基中加入链霉素，故只有重组子才能生长。每一种选择培养基的成分要根据基因型的特点去设计，如图 10.26 所示，最后用选择培养基上的菌落数可计算重组频率。

供体染色体上基因的顺序也能够由个别的基因转移来决定。例如，在中断杂交的过

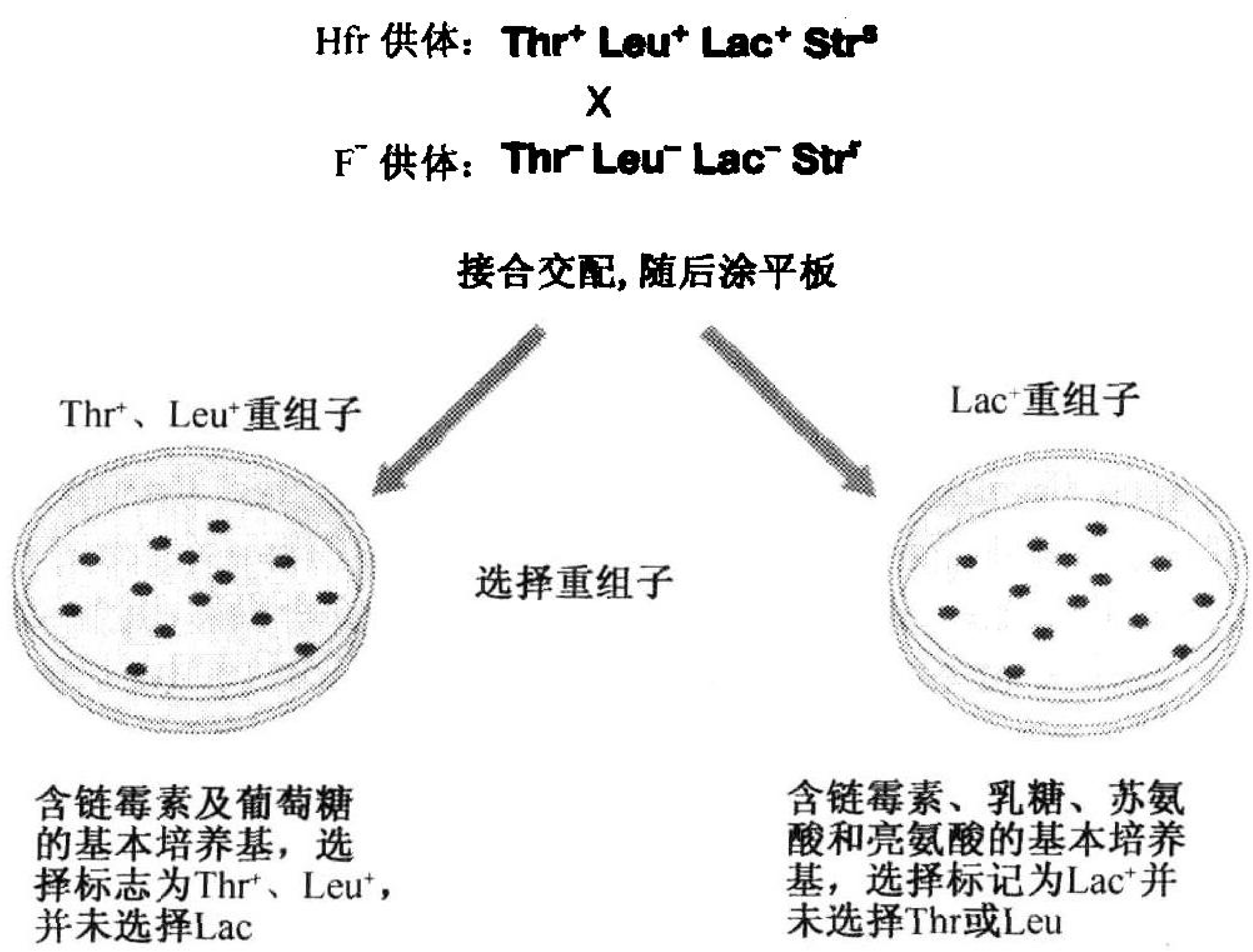


图 10.26　检测接合的实验实例。 Thr：苏氨酸；Leu：亮氨酸；Lac：乳糖；Str：链霉素。注意每种培养基可选择一类特殊的重组子。供体和受体在混合杂交前分别涂平板作为实验对照，任何一个亲本在所用的选择平板上都不应该生长。

程中，接合的细胞用搅动或搅拌就可以将它们分开。将 Hfr 和 F^- 细胞的混合物按不同时间取样进行搅拌使杂交中断，记下遗传重组子的数目，发现从配对到搅拌的时间越长，F^- 中出现的 Hfr 的基因就越多。如图 10.27 所示，邻近起点的基因首先进入 F^-，比后进入的基因有较高的百分比。图示也证明基因从供体到受体的转移是一个有序的进程，这一实验提供了测定细菌基因排列次序的方法（基因作图）。染色体上基因座位的排列称为遗传学图（genetic map）（见 10.19 节和图 10.42）。

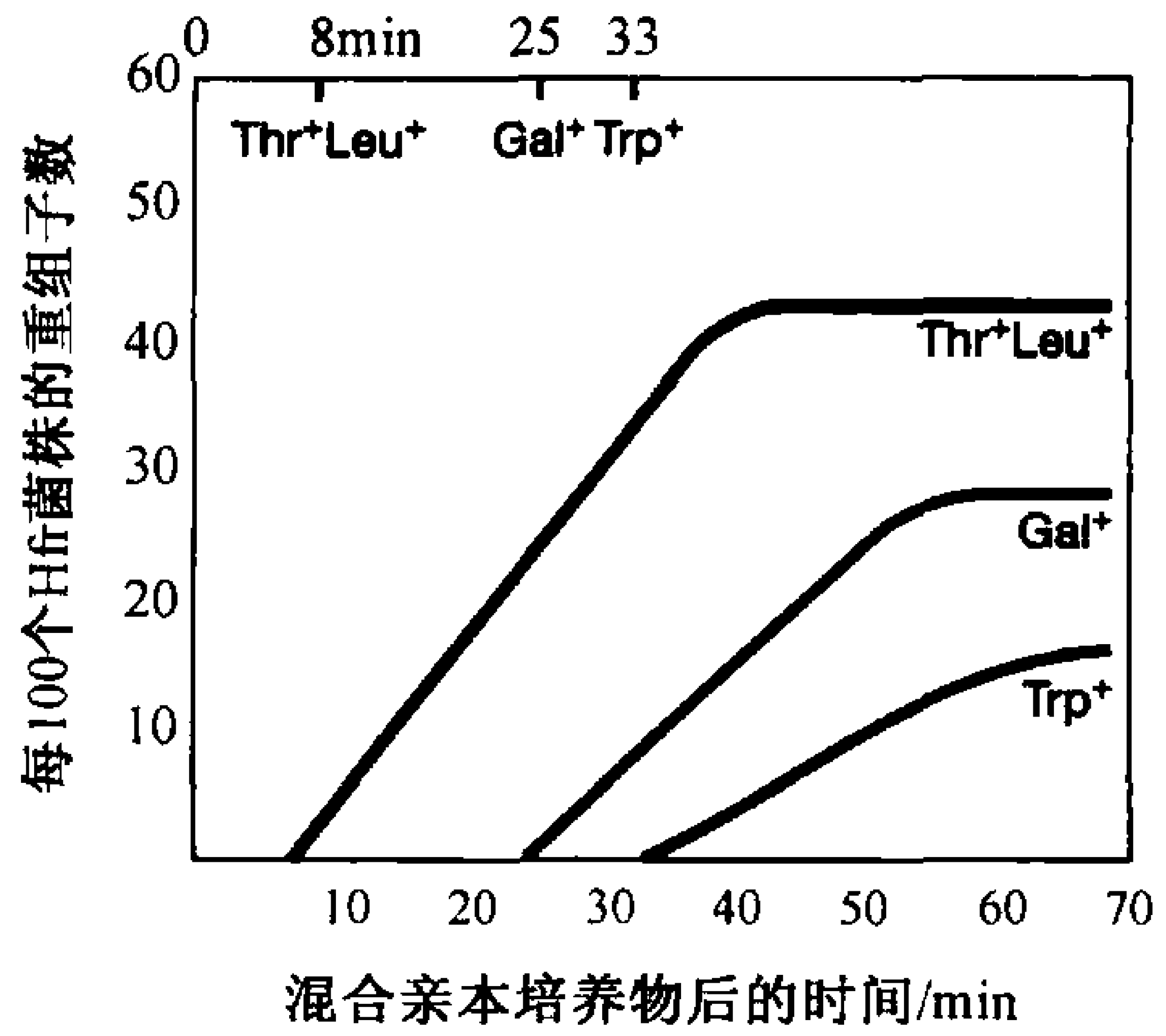


图 10.27　Hfr 与 F^- 混合后通过中断杂交法测定不同基因的重组频率。图上方左侧示 Hfr 染色体的基因位置。注意在重组子中检测到的第一个基因是邻近起点（0min）的基因。实验首先混合 Hfr 和 F^- 细胞，要求的条件是所有的 Hfr 细胞能找到受体。在杂交后的不同时间取样，剧烈振荡以分开接合对，然后涂在选择培养基上，长出的菌落为重组子。

染色体基因转移至 F 质粒

整合后的 F 质粒偶尔也可以从染色体上切离，切离时就有可能将染色体基因带入释放出的 F 质粒上。这一过程的发生是由于整合的质粒与染色体之间含有少数相同的 IS 序列，可以发生重组（图 10.23）。带染色体基因的 F 质粒称为 F′质粒。F′不同于正常的 F 质粒，它们含有可鉴别的染色体基因，因而能以很高的频率将这些基因转移进受体。这种 F′介导转移类似特异性转导（见 10.8 节），即仅限于部分染色体基因可以转移。转移一个已知的 F′质粒到受体中，则形成染色体上某一区域基因的二倍体（每一基因有两个拷贝），这种细胞称为部分二倍体（merodiploid）。这个过程对于下一节将要介绍的互补测验很重要。

其他接合系统

我们已经非常全面地讨论了大肠杆菌的接合，在许多革兰氏阴性菌中也发现了可接合质粒。不相容群的可接合质粒 IncP（见 10.8 节）在所有的革兰氏阴性菌中都有，甚至在不同属间转移。在革兰氏阳性菌中也发现了可接合质粒［如链球菌属（*Streptococcus*）、肠球菌属（*Enterococcus*）和葡萄球菌属（*Staphylococcus*）］。

几种可接合质粒也发现在古生菌的硫化叶菌属（*Sulfolobus*）中。对该属的接合了解不多，只知道质粒转移之前细胞配对及质粒单向转移。相关的基因功能与革兰氏阴性菌有一点相同。如古生菌的一个基因类似于 F 质粒介导接合中的 *tra G* 基因，其产物与稳定接合对有关。但这仅仅是一个例外，古生菌与细菌的接合机制完全不同。

概念检查

供体细胞的染色体能够转移到受体细胞中，这个过程需要 F 质粒整合到染色体中形成 Hfr 菌株。宿主的染色体很少情况下能全部转移，但是可用于染色体基因顺序的

作图。F′质粒是 F 质粒整合进染色体，再切离时含有某些染色体基因。

◆ 在大肠杆菌 F 质粒的接合过程中，寄主染色体是如何转移的?

◆ 为什么在 Hfr×F^- 的接合过程中不会产生两个 Hfr 菌株?

◆ 在染色体的哪些位点 F 质粒能够整合?

10.13 互补

细菌基因转移的所有过程都仅仅转移供体染色体的一部分。因此，供体 DNA 除非与受体染色体发生重组否则将会在受体细胞中由于不能够自主复制而被丢失。仅发现部分二倍体能够稳定存在的两个例子。一个是在特异转导噬菌体中供体的基因作为噬菌体基因组的一部分而存在（见 10.8 节）。另一个例子是供体的基因已经变成了附加体 F 质粒的一部分形成 F′质粒（见 10.12 节）。由于可通过重组 DNA 技术创造特异转导噬菌体或者特殊的质粒（见 10.15 节～10.17 节），那么就有可能把细菌染色体的任何一部分重组到噬菌体或质粒中，这种方法在细菌遗传分析中很有用，下面将介绍这方面内容。

互补测验和顺反子

两个突变菌株经遗传杂交（交配）和同源重组后，除非原突变具有相同的碱基，一般都会形成野生型重组子。大肠杆菌的两个不同的 Trp^- 突变型（即需要在培养基中加入色氨酸的菌株）杂交后，可得到 Trp^+ 重组子。由此可证明两菌株不是相同碱基的突变。这一实验还不能肯定是否为相同基因的不同区域突变，要做互补测验（complementation test）才能确定。

继续以色氨酸营养缺陷型为例，如果由于突变而使某一菌株中的色氨酸基因失活，其表形则为色氨酸营养缺陷型 Trp^-。然后将带有野生型基因拷贝的质粒或病毒基因组转进 Trp^- 细胞，将会使缺陷型细胞恢复野生型表型，所形成的这一部分二倍体细胞应该是 Trp^+。也就是说野生型基因正好与所突变的基因互补。那么互补测验是怎样检测出突变是发生在相同的基因中的呢?

尽管在接合过程中只转移一段染色体片段，但是会含有若干个基因。在色氨酸的例子中，前面曾介绍过与色氨酸的生物合成有关的基因形成一个操纵子（图 8.24），因此整个操纵子能够很容易的从供体细胞转移到受体细胞中。需要注意的是即使供体的操纵子也有一个突变，但两个突变不在同一个基因，那么在受体细胞中两个突变基因便可发生互补。可以说这两个突变是互补的，该过程见图 10.28。如果每一个同源的 DNA 分子都能提供一个不同的所需要的基因，那么这个细胞将含有合成色氨酸所需要的所有的酶。

需要着重指出的是，互补过程没有发生重组。在做互补测验时，所涉及的突变必须位于两个不同的 DNA 分子：染色体和携带基因的载体（质粒或病毒 DNA），这种突变是反式结构。如果一个分子上带有两个突变，这种情况称为顺式结构，只有第二个分子中相对应的基因都是野生型才能与其互补。因此在互补测验中顺式突变通常被用作阳性对照，这类互补测验也称为顺反测验（cis-trans test），被用来测定两个突变是否属于同

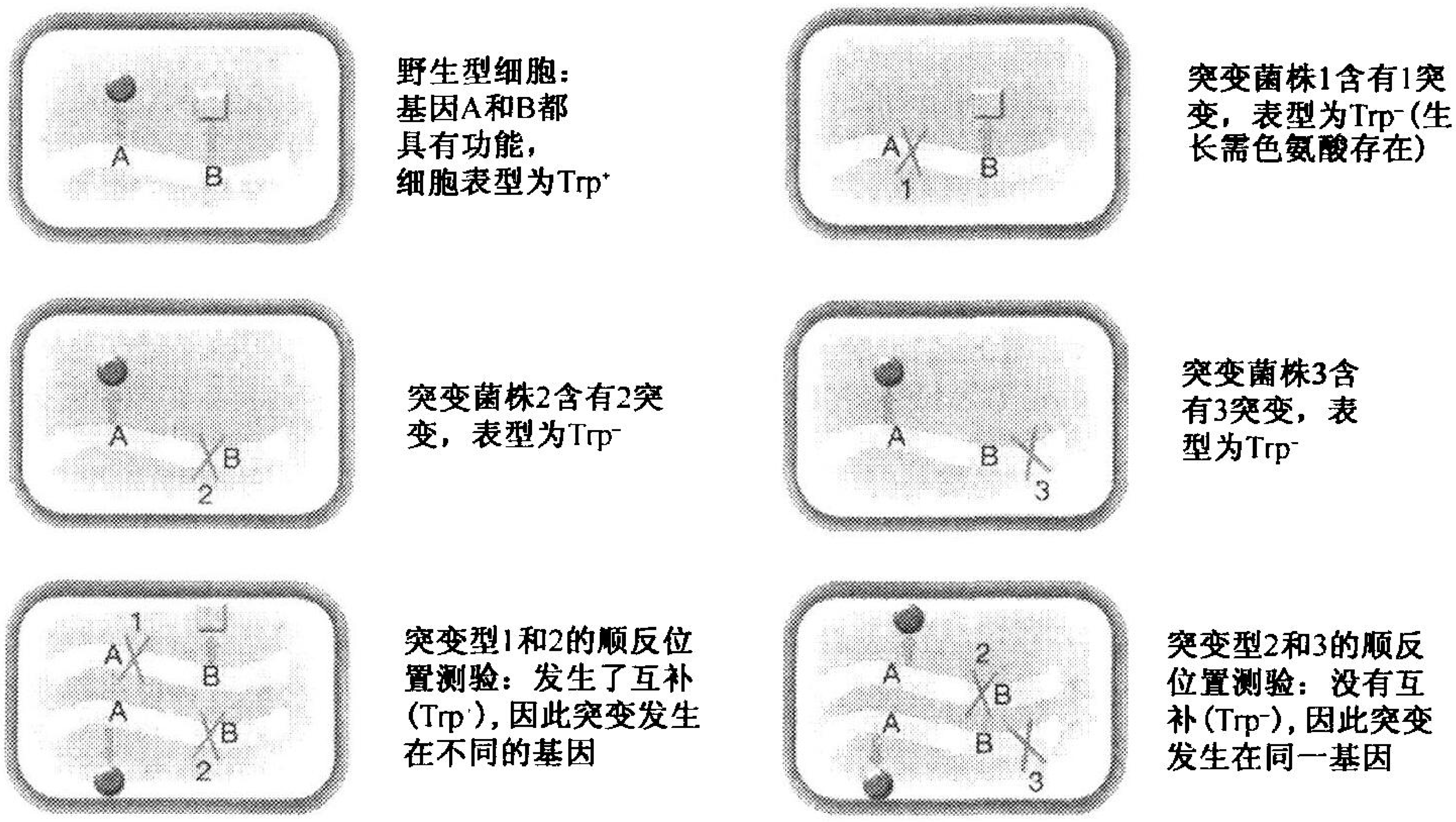


图 10.28　互补分析。在这个例子中基因 A 与基因 B 所编码的蛋白质产物都是合成色氨酸所必需的，突变 1、2、3 都会产生相同的表型即色氨酸缺陷型（Trp^-）。通过互补分析证明突变 2 和 3 发生在相同的基因中，而突变 1 发生在另一基因中。

一个基因。在顺反测验中，一个遗传单位称为一个顺反子（cistron）（实质上等同于一个基因）。如果两个突变发生在编码不同酶或者同一酶的不同亚基的基因中，则可能互补，即两个突变基因属于不同的顺反子。

虽然在细菌遗传学中涉及互补分析的遗传杂交始终被使用，但目前在许多情况下能够很容易地测出所需基因的序列，通过分析基因序列来判断突变的位点与特性。如果知道野生型基因的序列，就能够通过使用高特异性的引物来快速测出 DNA 的序列。现在在微生物遗传学中很少用到顺反子这个名词了，除非用来描述一个 mRNA 分子所携带的遗传信息是来自一个基因还是来自更多的基因，前者称为单顺反子 mRNA，后者称为多顺反子 mRNA（见 7.13 节）。

概念检查

如果一个经过处理的细胞含有其基因组一段区域的两个拷贝，便可进行互补测验，来判断两个突变是否属于同一基因。这种分析是有必要的，因为同一代谢途径中不同基因的突变也有可能产生相同的表型。互补测验中不发生重组。

◆ 什么是部分二倍体？

◆ 请解释为什么互补测验又被称为顺反测验？

10.14 转座子和插入序列

细菌染色体上的基因顺序可利用基因转移的方法测定，就像利用杂交实验为真核生物染色体基因作图一样。然而，染色体基因的精确的排列次序并不一定是永远固定的，

某些基因可以移动。基因从基因组的一个位置移到另一个位置的过程称为转座（transposition）。转座在进化和遗传分析中是一个重要的过程。

转座是稀有的事件，每一世代发生的频率为 $10^{-5} \sim 10^{-7}$。因此，大多数基因是相对稳定的。此外，并非所有的基因都可以转座，基因转座与特殊的遗传因子存在有关，它们称为转座因子（transposable element）。转座现象最初是在玉米中而后在细菌中被发现，因为在细菌中进行此类遗传分析相当灵敏。具有转座因子特性的 DNA 序列在自然界的生物中广泛存在。

转座子和转座因子

前面曾讨论过（见 7.4 节），细菌中有 3 类转座因子：插入序列、转座子以及一类特殊的病毒（如 Mu）（见 16.5 节）。本节我们主要讨论的范围是插入序列（IS）和转座子。这两类转座因子具有两个共同重要的特征，首先都带有编码转座酶（transposase）的基因，转座酶是转座时必需的；其次在它们 DNA 的尾部都有较短的末端反向重复序列（此处的“尾部”是转座因子与它所插入的任何 DNA 分子的连接处）。这些重复序列的长度不同，简单的 IS 因子少于 20bp，而某些转座子则大于 1000bp；每一种插入序列的末端重复序列都具有特异的碱基数目。这一重复序列与转座过程有关。图 10.29 是常见的 IS*2* 和 Tn*5* 转座子的遗传学图。

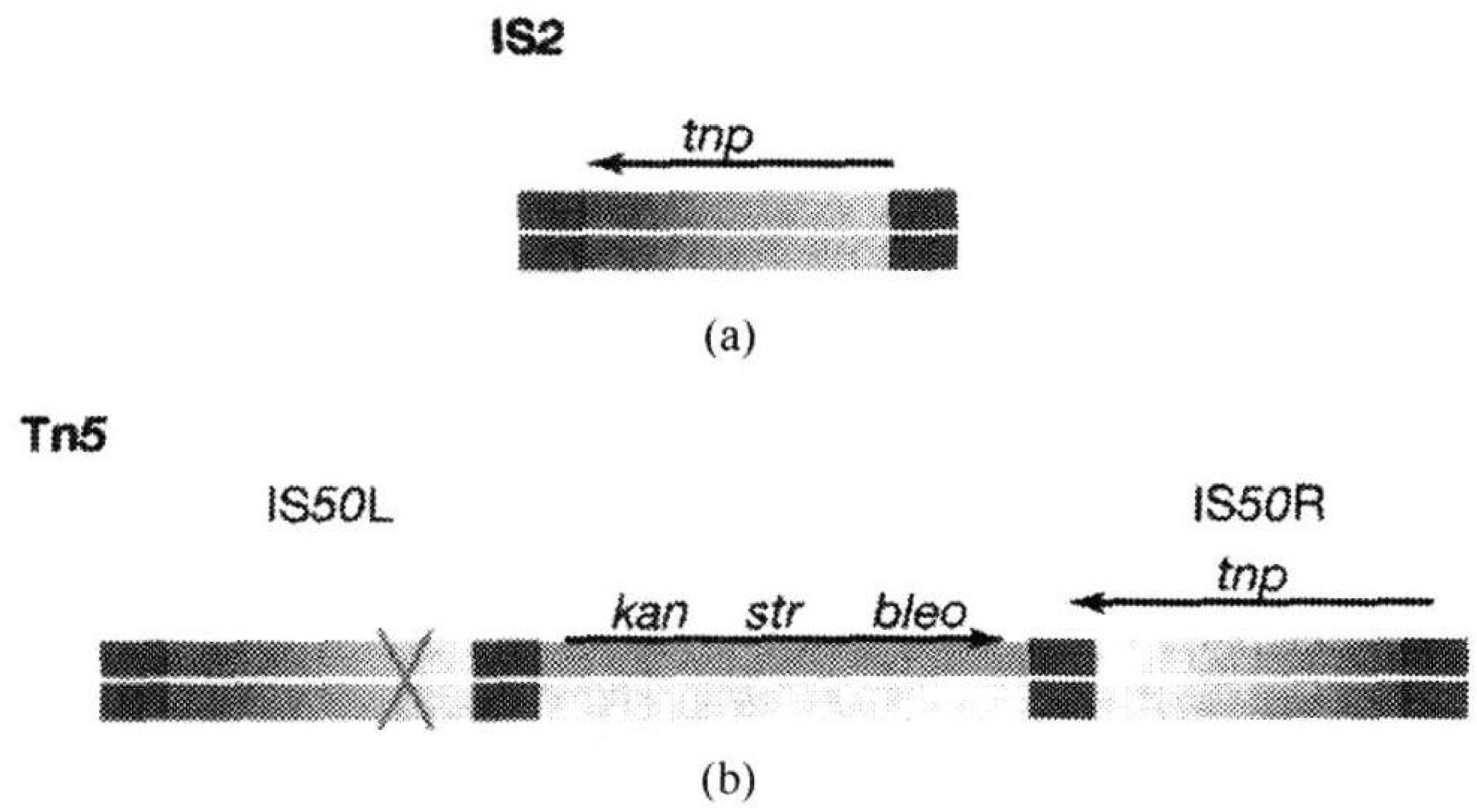


图 10.29 转座因子 IS*2* 和 Tn*5* 的遗传学图。反向重复序列用红色表示，图上箭头是转座因子上基因的转录方向。*tnp* 是编码转座酶基因。(a) 插入序列 IS*2* 长 1327bp，两端的反向重复序列为 41bp。(b) Tn*5* 是一个 5.7kb 的复合转座子，左右两端具有两个插入序列，分别为 IS*50*L 和 IS*50*R。IS*50*L 不能独立转座，因为它的转座酶基因内带有无义突变（见 10.2 节），用 X 表示。此外，两个 IS*50* 几乎是相同的。*kan*、*str*、*bleo* 分别表示卡那霉素（新霉素）、链霉素和博来霉素抗性基因。Tn*5* 作为诱变工具普遍用于大肠杆菌及其他革兰氏阴性菌。

插入序列（insertion sequence）是最简单的转座因子类型，除带有与转座有关的基因外，不再有任何基因。其 DNA 片段较短，大约 1000 个核苷酸，可整合进基因组的特异位点。插入序列不仅发现于染色体和质粒 DNA 上，在某些噬菌体里也有。几百种不同的 IS 已被鉴定，按照鉴定顺序分别命名为 IS*1*、IS*2*、IS*3* 等。

IS 分散在染色体上，每一菌株 IS 的出现频率和数目上是不同的，如一株大肠杆菌具有 5 个拷贝的 IS*2* 和 5 个拷贝的 IS*3*。很多质粒中也带有这种插入序列（图 10.18 和图 10.20）。质粒和染色体就是在这些相同的 IS 间进行同源重组，并非通过转座，使 F

质粒能整合进细菌染色体，并带动其转移（见 10.12 节和图 10.23）。一些古生菌染色体上有大量的插入序列，说明转座是所有原核生物的一种特征。

转座子（transposon）比插入序列大，并带有一些其他的基因。某些基因使它们的宿主有重要的特性，包括药物抗性标记及易于筛选的基因。此外，还有可接合转座子，其可通过接合在细菌种间移动。这些转座子带有的基因不仅允许它们在一个细菌的基因组内从一个座位移到另一个座位，同时还可以从一个细菌移至另一个细菌（见 10.11 节）。某些转座子实际上是一种复合遗传因子，在两端的插入序列之间含有一个或一组基因。这种复合转座子的存在说明，在具有插入序列位点相互接近的细胞中，新的转座子可能会不断地形成。

转座和微生物进化

如前所述，转座因子两端的重复序列及转座酶对于转座是必需的。转座酶在转座过程中主要负责识别、切割和连接 DNA 分子（图 10.30）。当转座因子插入靶 DNA 时，靶位点上的一个短序列则会发生复制。首先由转座酶切断单链，然后转座子连到所产生的两个单链末端，再通过对单链空缺部位的修复合成，便导致靶序列的复制（图 10.31）。

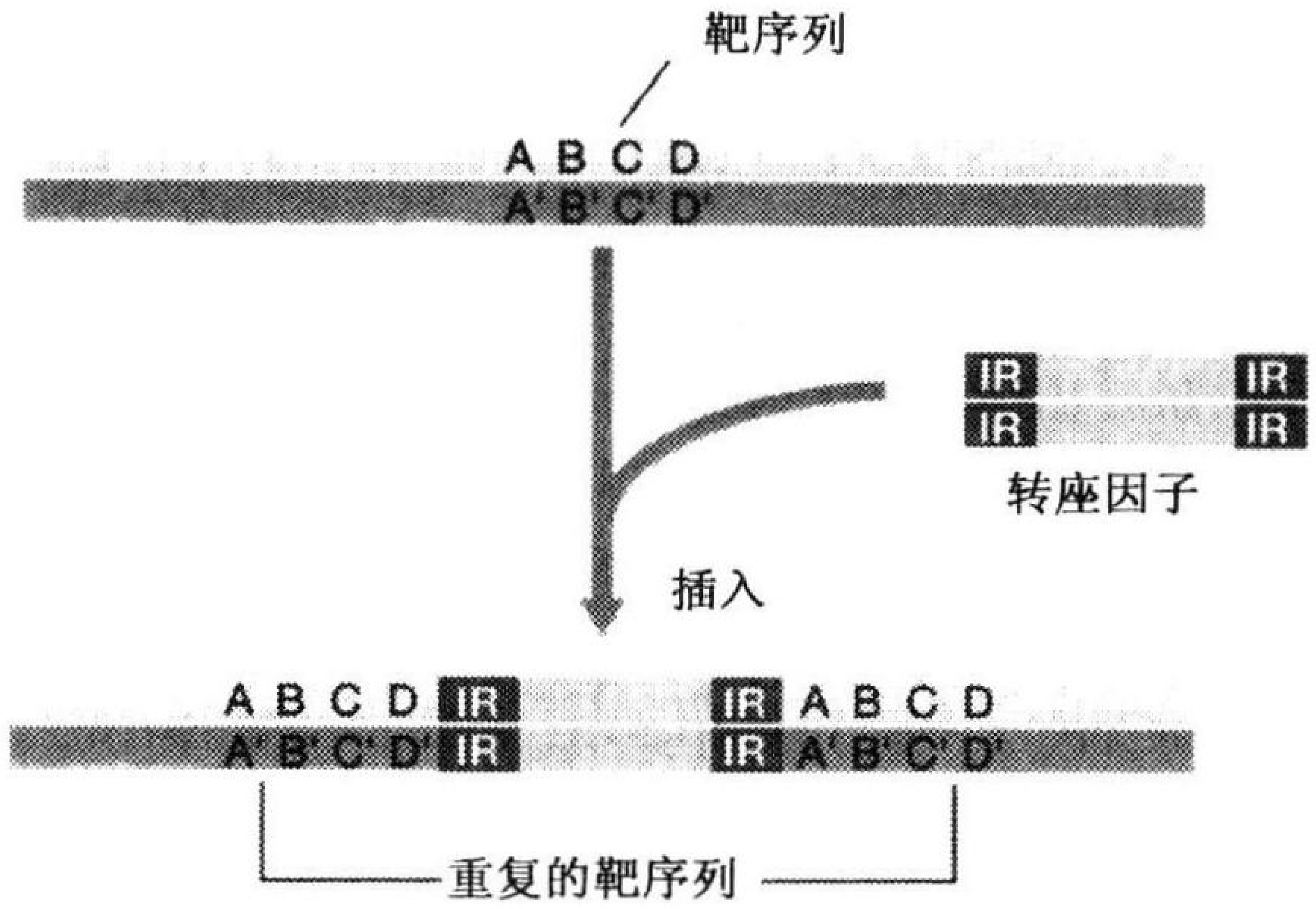


图 10.30 转座过程。转座因子的插入引起靶序列的复制。注意转座因子两端存在反向重复序列（IR）。图 10.31 更加详细地介绍了转座机制。

如果复制的 DNA 具有重复的某一完整基因或一组基因，那么该生物体就将包含这些特殊基因的多个拷贝。这种基因重复（gene-duplication）现象被认为是微生物进化的动力。这是因为突变在基因的一个拷贝中发生并不影响基因的另一拷贝；这些错误蛋白质的功能仍被未突变的基因产物“掩蔽”着。然而，一个拷贝中有利的突变可产生比正常蛋白质更优异的蛋白质产物从而使生物获益。这样，一个基因拷贝可“实验”进化，而该基因的另一拷贝则提供必要的功能支持。基因组分析显示，编码蛋白质基因的很多例子都来自这种基因重复。

转座机制

已研究清楚两个转座机制，分别称为保守型和复制型（图 10.31）。Tn5 为保守型

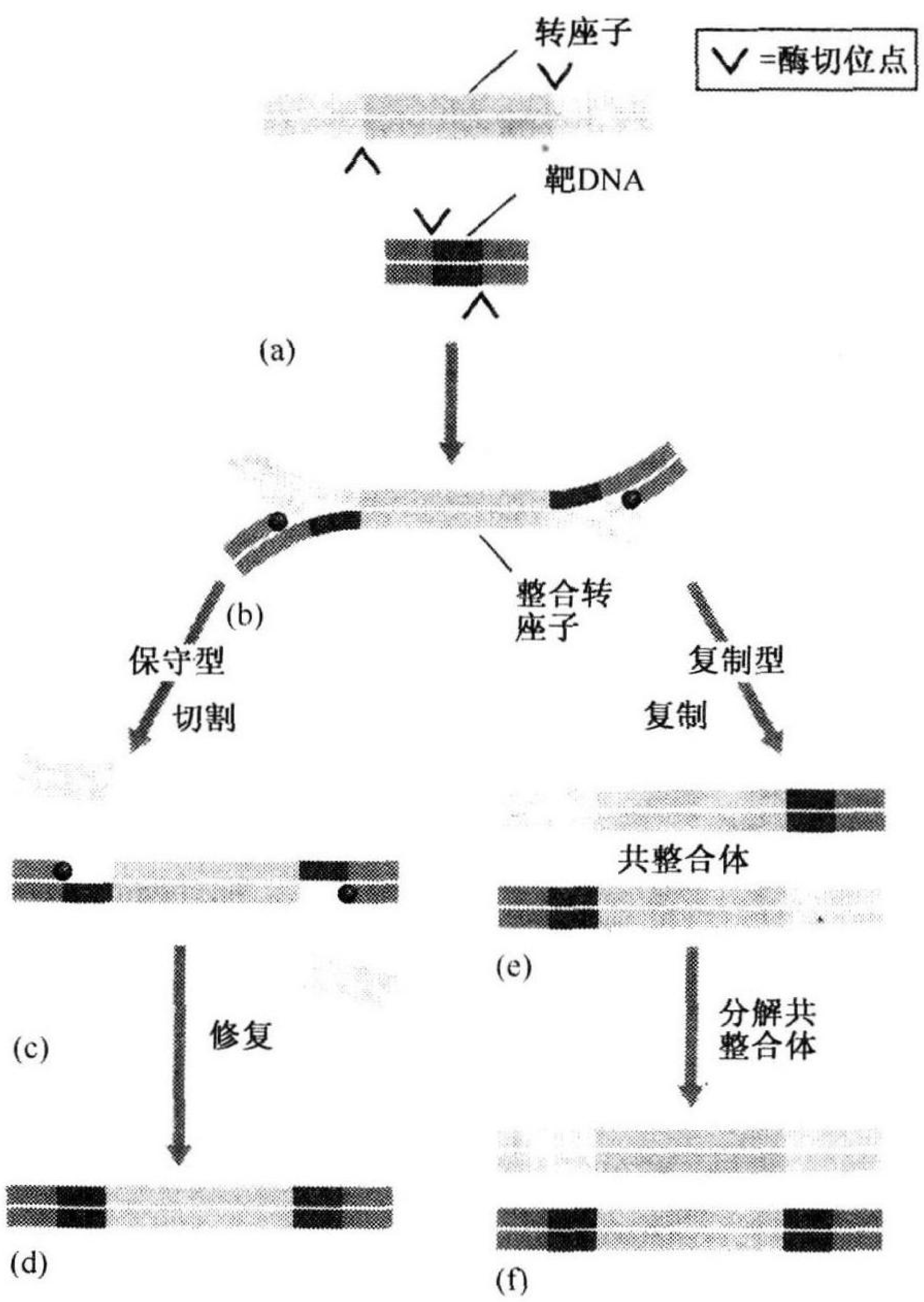


图 10.31 转座机制。为简明起见，供体 DNA（带有转座子）用浅绿色表示，带有靶序列的 DNA 用深绿色表示。(a) 在保守型转座和复制型转座中，转座酶将转座因子的 DNA 末端（橙色）和靶位点（红色）分别切断（箭头表示）。不同转座机制中所切割的碱基数目和位置不同。(b) 靶位与转座因子连接。黑色小球表示游离的 DNA 3′端，复制由此开始（见 7.5 节和 7.6 节）。(c) 在保守型转座中，进一步的切断在 DNA 复制/修复前就已经发生，使可转座因子从供体 DNA 上完全消失。(d) DNA修复使靶位点复制并完成转座过程。(e) 在复制型转座中，转座因子复制后并非从供体位点切除，导致转座因子具有两个拷贝，并成为共合体的一部分。注意，这将导致供体和靶 DNA 分子连接在一起。(f) 这些分子进一步的分离（解体）。共整合体的解体将在图 10.32 中详细介绍。

转座（conservative transposition），它从染色体的一个位点上切离下来，再插入第二个位点，因此这类转座子的数目总保持一个。复制型转座（replicative transposition）则相反，如噬菌体 Mu（见 16.5 节），转座中产生一个新的拷贝，插入到染色体的另一个位点。这样，经过一次复制型转座，转座因子的一个拷贝仍留在原来位点，而另一个拷贝则在新的位点出现。

图 10.31 描述了保守型和复制型转座的模型。如图所示，转座子的两个单链末端（反向重复序列）分别被切开，靶 DNA 序列上两个单链也被交错的切开。转座子通过单链尾部连接到靶序列上。在保守型转座中，供体位点被切下，靶序列上的单链空缺部分再修复合成上。此过程使转座子两端的靶序列形成同向重复。在复制型转座中，复制修复发生在转座因子仍然与原供体以及靶位点相连状态，形成的这一复合结构称为共整

合体（cointegrate）。最后共整合体分离解体，使原来的转座子释放出来，而在靶序列处又增加了转座子的新拷贝（图 10.32）。

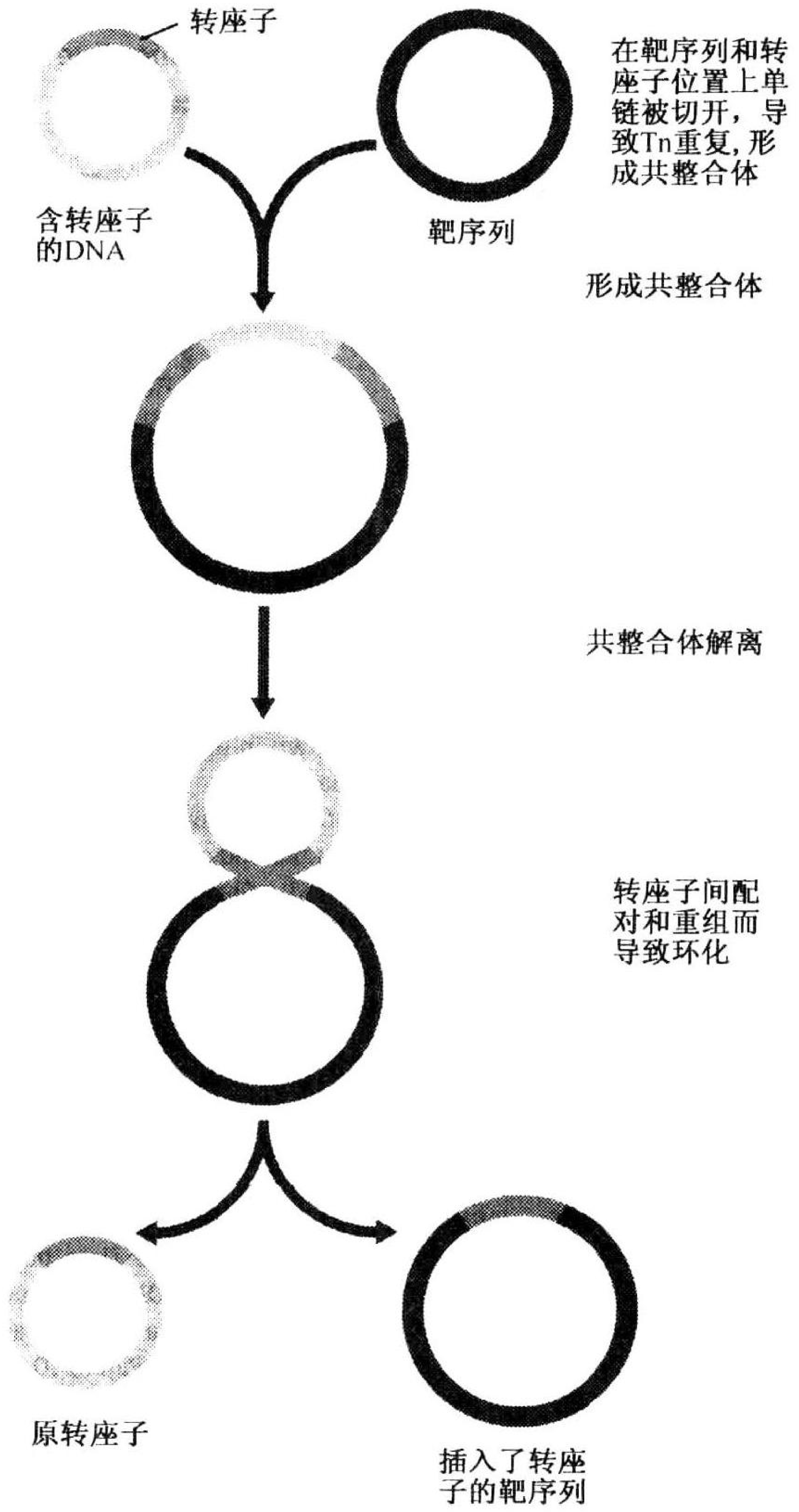


图 10.32 复制型转座。单链形成切口，两个分子结合成共整合体结构（图 10.31），重组后共整合体分离，原来的转座子与靶序列上的转座子复制体分开。

转座实质上是一个重组过程，但并不是发生在两个同源序列之间，也不利用细胞中一般重组系统，即并不利用一般重组所需的 RecA 蛋白（图 10.9）。因为这一重组涉及特异的碱基序列，因此称为位点特异性重组（site-specific recombination）（以区别 10.6 节讨论的同源重组）。

利用转座因子诱变

如果转座因子插入位点在一个基因内，转座子的插入将会引起突变（图 10.33）。因此转座子提供了一种诱变染色体突变的手段。在这类诱变中使用最方便的就是带有抗

生素基因的转座子诱变（transposon mutagenesis）。这样利用抗生素抗性很容易筛选到有转座子的细胞，如果这一抗性菌落是在允许任何缺陷型生长的丰富培养基上得到的，接下来再用补充生长因子的基本培养基筛选，确定突变型需要哪一种生长因子。

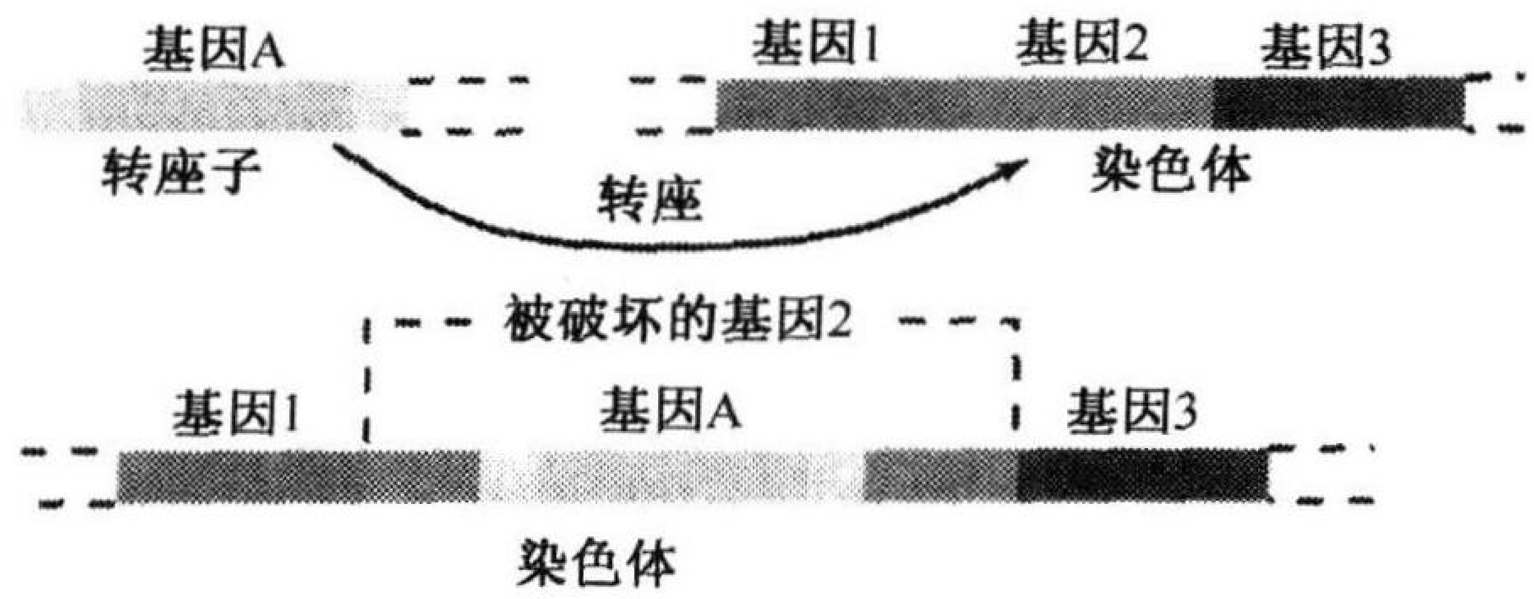


图 10.33 转座子诱变。转座子插入基因 2 的中部，基因 2 被转座子隔开而失活，转座子上的基因 A 将会在两个位置上表达。

也可用转座子将某个营养缺陷型基因标记引进野生型细胞。正常情况下营养缺陷型是不能用阳性选择法筛选的（图 10.2）。但如果将这一基因引进转座子，转座子上有抗性标记，那么就可以选择抗性菌落。这是一种阳性选择法，自然被选出的细胞中也含有引进的营养缺陷型标记。常用于诱变的转座子有两个，一个是 Tn*5*，含新霉素和卡那霉素抗性基因（图 10.30），另一个是携带四环素抗性基因的 Tn*10*（图 10.20）。

整合子

整合子（integron）是能从其他来源获得并表达基因的转座因子。然而，与其他转座子不同的是，整合子并非随机插入，而是对插入位点有很高的选择性，通常插入到质粒中。

整合子含有一个基因，编码整合酶（integrase），该酶在位点特异重组中是必需的。噬菌体 λ 基因组整合到大肠杆菌基因组的特异位点就需要 λ 整合酶（见 9.11 节）。整合子还包含一段称作盒（cassette）的特异 DNA 序列，可允许在整合酶作用下插入一组基因。该 DNA 序列与启动子一起允许新插入的基因表达。

整合子可以成为转座子、质粒甚至细菌染色体的一部分。有些整合子含有 5 个不同的基因盒。在这些基因盒上已鉴定出 40 多个不同的抗性基因，还有一些基因与特定病原细菌的毒力有关。图 10.34 显示铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）（有重要

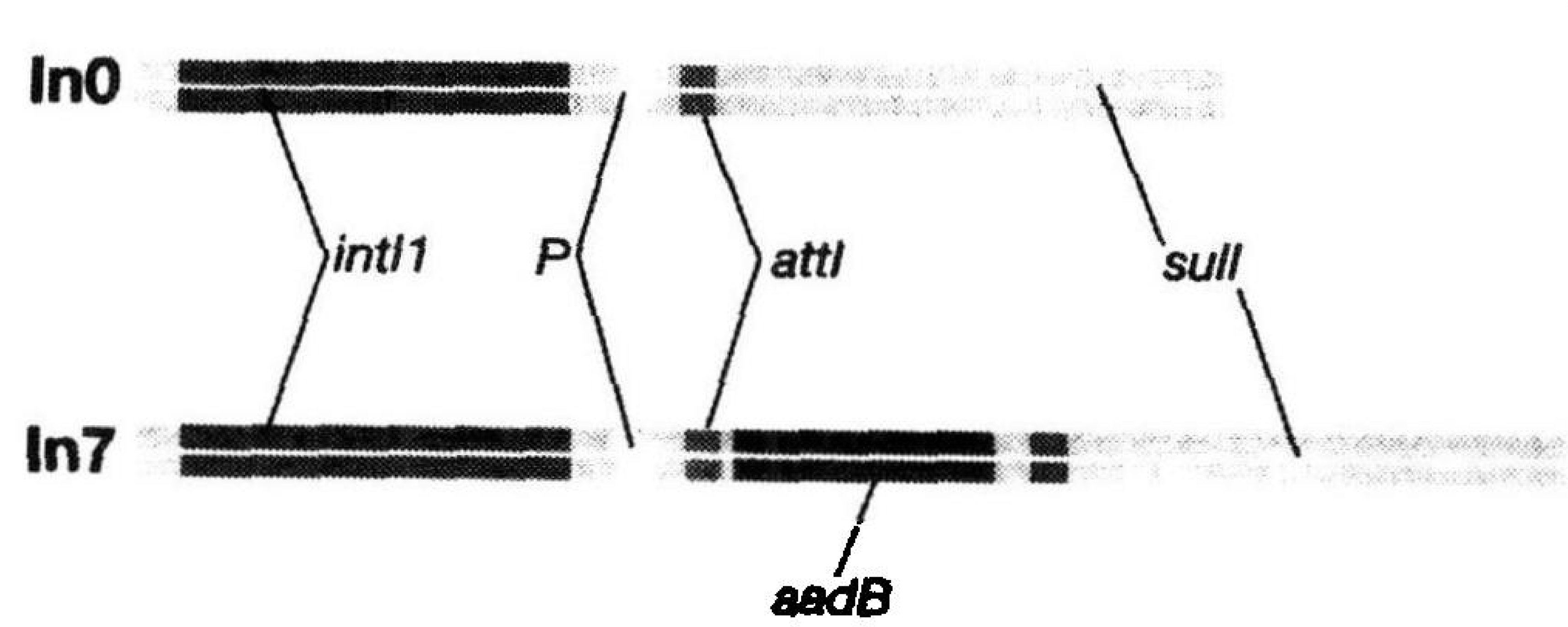


图 10.34 假单胞菌两种自然整合子的结构。整合子 lnO 具有基本的一套基因：*intI1*，编码整合酶；*attI*，整合的特异位点；P，启动子；*sulI*，含有自身启动子的磺胺药物抗性基因。整合子 ln7 包含所有上述基因，还整合进一个基因盒。所有的盒都含有一个特异重组位点（蓝方形）。图示盒含有 *aadB*，表示氨基糖苷类抗生素抗性基因。

的潜在致病菌）两种整合子的结构。整合子在多种细菌中被发现，通常是临床分离的细菌。很明显，这些细菌都是在医院和临床抗生素丰富的环境下，通过基因水平转移而被选择出。基因盒捕获的基因不是一般的随机基因，而是①与可被整合酶识别的特异 DNA 序列结合的基因，或者②插入整合子前明显不表达、而利用整合子的启动子能够被转录的基因。

概念检查

转座子和插入序列是一种通过转座机制可从染色体的一个位置转移到另一个位置的遗传因子。转座是一类位点特异重组，既有保守型转座也有复制型转座。转座子通常带有抗生素抗性基因。转座因子可作为生物诱变剂。

◆ 插入序列和转座子有哪些共同特征？

◆ 什么是整合子？它与转座子有何不同？

Ⅲ 细菌遗传学和基因克隆

我们已经讨论了遗传交换的三种机制：转化（见 10.7 节）、转导（见 10.8 节）和接合（见 10.9 节～10.11 节）。这些机制常用于细菌杂交及多种原因的重组子选择，包括绘制生物的遗传图谱、构建新的菌株或特异地研究生物体代谢的遗传和生化。然而，用这些技术在体内进行杂交还是受到限制的，故可用体外（在试管中）操作 DNA 技术来弥补。本章下面的几节内容将讨论这些体外技术。

这里描述的技术大多是用于分子生物学研究的工具盒：①限制性内切核酸酶；②凝胶电泳和核酸杂交；③DNA 测序、DNA 探针的合成以及 PCR。这些内容在 7.7 节～7.9 节分别也曾涉及。在此之前复习一下这些章节是很有用的。下面我们从分子克隆开始，这是通过研究人员的简单操作，在小分子 DNA 上获得特异基因的技术。

10.15 分子克隆的要素

分子克隆（molecular cloning）是基因工程和大多分子遗传过程的基础，能够很容易地对基因组进行详细的分析。基因克隆的目的是获得提纯的、特定基因片段的大量拷贝。即使像大肠杆菌这样遗传上十分简单的生物，其基因组也为 4700kb，一个基因为 1～2kb，平均每个大肠杆菌基因不到整个细胞全部 DNA 的 0.05%。而对于人类来说这个问题就更加复杂。因为人体细胞中每个基因编码区的长度并不比大肠杆菌的长，但基因被分割成片段，其基因组却是大肠杆菌的 1000 倍。如何获得特异基因的多个拷贝？

如果一个感兴趣的基因被分离到并放在一 DNA 片段上，该 DNA 的复制可由实验者控制，则得到整个片段（和感兴趣的基因）的多个拷贝就有可能。分子克隆的基本策略就是从大的、复杂的基因组中得到一个小的、简单的目的基因（图 10.35）。幸运的是，根据现有的 DNA 化学和酶学知识，可对 DNA 进行体外切割和连接，这一过程称为体外重组。限制性内切核酸酶、DNA 连接酶、PCR 及 DNA 合成都是体外重组的重

要工具。

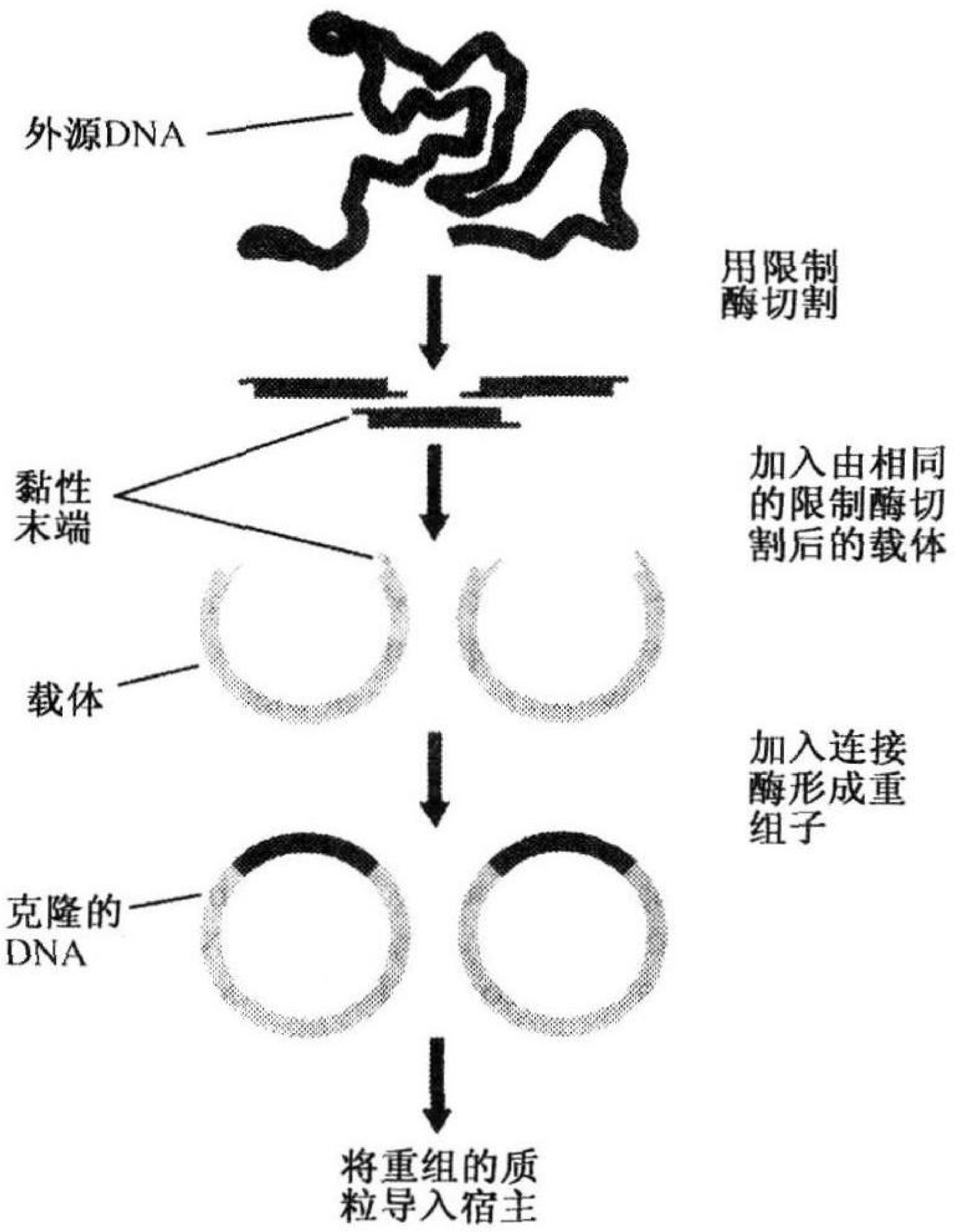


图 10.35 基因克隆的主要步骤。载体可以是质粒或病毒基因组。通过用相同的限制性内切核酸酶切割外源 DNA 和载体 DNA，就可以形成能互补的黏性末端，使外源 DNA 成为载体的一部分。

基因克隆的步骤

基因克隆分为以下几步：

1. 分离和切割外源 DNA。外源 DNA 可以是感兴趣生物的全部基因组 DNA，也可以是由 RNA 反转录合成的 DNA（见 9.13 节），还可以是用聚合酶链反应得到的 DNA（见 7.9 节），甚至是在体外全部化学合成的 DNA（见 7.8 节）。如果外源 DNA 位于基因组中，通常先用限制性内切核酸酶切割，得到许多一定大小片段的混合体（图 10.35）。

2. 利用连接酶将 DNA 片段连接到克隆载体上。克隆载体是指能独立复制的较小的遗传单位，可用于复制外源基因，大多衍生自质粒和病毒。克隆载体通常带有限制性内切核酸酶位点，从这些位点切开，可插入外源 DNA，同时又不影响载体的复制（图 10.35）。如果外源基因和载体是用同一限制性内切核酸酶切割的，则它们之间可依靠单链“黏性末端”区域退火连接（图 10.35 和图 7.21）。由某些限制性内切核酸酶产生的“平末端”，可通过合成的 DNA 接头（linker）或连接物（adapter）连在一起。最后必须由 DNA 连接酶封住磷酸二酯键。在 10.15 节和 10.16 节及第 31 章中将进一步论述克隆载体的性质。

3. 将重组 DNA 分子引入宿主细胞，并使其稳定存在。重组 DNA 分子可利用转化（见 10.7 节）等方法在试管中转入宿主细胞，并在宿主细胞内复制（图 10.35）。将 DNA 转入宿主细胞通常会产生许多不同的克隆。其中一些细胞含有目的克隆基因，另一些则是该生物其他 DNA 片段与载体连接的重组体。这种混合体称为 DNA 文库（DNA library）或基因文库（gene library），因为从中可以纯化出不同的克隆，每个克隆含有该生物的不同 DNA 片段。通过克隆基因组的随机片段构建基因文库的方法称为鸟枪法克隆（shotgun cloning），该技术在基因克隆和基因组分析中广泛应用（见 15.1 节和 15.2 节）。

接下来将详细讨论用于克隆载体的质粒和病毒的特性。

概念检查

在分子克隆中，常用质粒或病毒作为克隆载体，分离特异基因或染色体区域。限制

性内切核酸酶及 DNA 连接酶是进行体外重组过程获得杂合 DNA 分子的重要工具。一旦导入适当的宿主，在克隆载体的控制下可以获得大量目的基因。

◆ 分子克隆的目的是什么？

◆ 在分子克隆中，克隆载体、限制性内切核酸酶及 DNA 连接酶的作用是什么？

10.16 作为克隆载体的质粒

质粒的复制是独立于宿主染色体进行的（见 10.9 节）。大多数质粒除了带有复制所需要的基因外，还携带有一些特殊的基因，可赋予宿主某些重要性状。因此，许多质粒是天然的载体。质粒具有许多适合作为克隆载体的性质：①分子质量小，易于分离和操作；②质粒具备自身的复制起始位点，可独立复制不受染色体控制；③多拷贝，在细胞中可有几个或大量拷贝存在，扩增了 DNA；④携带如抗药性等选择标记，便于选择含有质粒的克隆。

在自然环境中，接合型质粒是依靠细胞间的接触而进行 DNA 转移的。为了防止生物污染，遗传修饰的载体质粒不能接合转移。在实验室中，载体质粒的转移是依靠转化或人工的电穿孔转化进行（见 10.7 节和 31.2 节）。依照宿主—质粒系统，质粒复制分为严谨型和松弛型两种。严谨型质粒只有几个拷贝，松弛型质粒具有高拷贝。对于基因克隆来说，高拷贝数十分重要。选择适当的宿主-质粒系统、通过改变细胞大分子的合成，每一细胞的质粒拷贝可以达到几千个。

质粒 pBR322

10.9 节中，我们讨论了 F 质粒在大肠杆菌体内，如何从染色体上获得基因成为 F′质粒。因此，可能会有人想到用 F 质粒作为体外克隆载体。但 F 质粒太大（大约 100kb，见图 10.18），并且没有选择标记，因此不能作为克隆载体。尽管如此，第一个克隆载体就是自然分离的质粒。虽然它们很快被代替，但很多是利用它们本身经体外操作而产生。质粒 pBR322 就是这类修饰过的克隆载体的例子，它可在大肠杆菌中复制（图 10.36）。质粒 pBR322 具有很多适合作为克隆载体的优点：

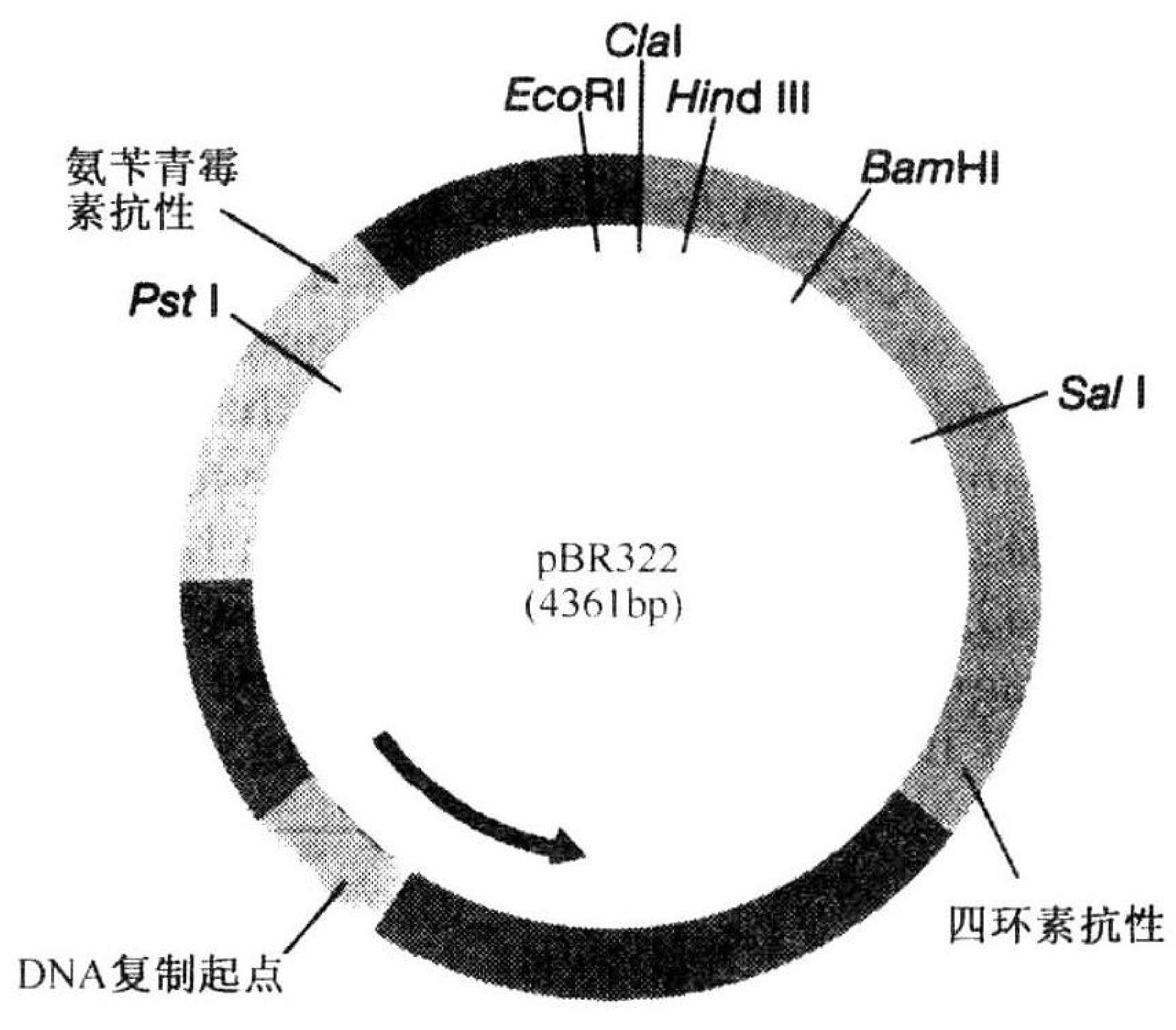


图 10.36　广泛应用的克隆载体 pBR322 的结构。显示了抗性标记和限制性内切核酸酶位点等基本特征。箭头指示 DNA 复制起点的方向。

（1）分子质量小，长度只有 4361bp。

（2）在宿主细胞内（大肠杆菌）以较高的拷贝稳定存在，每一细胞可达 20～30 拷贝。

(3) 用氯霉素抑制宿主细胞的蛋白质合成，可使 pBR322 大量扩增（每个细胞 1000～3000 拷贝，占整个基因组的 40%）。

(4) 以超螺旋形式存在，易于用各种常规技术分离。

(5) 可携带一定大小于的外源 DNA 片段，但片段大于 10kb 会导致质粒不稳定。

(6) 已测定了 pBR322 的全部碱基序列，因此可以确定全部限制性内切核酸酶作用的位点。

(7) 具有多种限制性内切核酸酶的单一切点，如 *Pst* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ 及 *Bam*H Ⅰ 等。对于给定的限制性内切核酸酶单一的酶切位点是很重要的，因为当用某一限制性内切核酸酶消化质粒后，会得到一条全长的线型分子而不是若干片段。存在多种限制性内切核酸酶的单一位点，使载体的应用更为方便和广泛。

(8) 携带赋予宿主氨苄青霉素及四环素抗性基因。使选择含有质粒的宿主更为方便，因为宿主具有两种抗生素的抗性。在抗性基因内存在限制性内切核酸酶位点，使得对带有外源 DNA 的质粒的鉴定更为方便（见后）。

(9) 通过转化和人工转化易于进入受体细胞（见 10.7 节）。

基因克隆进 pBR322

pBR322 在基因克隆中的应用见图 10.37。四环素抗性基因含有 *Bam*H Ⅰ 切点，氨苄青霉素抗性基因内含有 *Pst* Ⅰ 切点。如果将一外源片段插入两个酶切位点之一，就会使抗性基因失活，这种现象称为插入失活（insertional inactivation）。利用插入失活可以检测携带外源基因的质粒。当 pBR322 经 *Bam*H Ⅰ 切割后，连上外源 DNA，并转入宿主。那些既抗氨苄青霉素，又抗四环素的克隆是缺少外源片段的（在这些细胞中的质粒是自连的结果，而没有连接上外源 DNA），而那些抗氨苄青霉素，对四环素敏感的细胞含有的质粒携带了外源 DNA。由于可在不同平板上分别检测细胞对氨苄青霉素和四环素的抗性（图 10.2），因此可以很容易地挑选出目的菌株并淘汰不含正确质粒的细胞。

第二代质粒载体

质粒 pBR322 代表早一代的克隆载体，其部分是由遗传工程构建的。现在新一代的质粒载体有更好的克隆特征，使用起来更简单。新的特征包含了多克隆位点（也叫多位点接头），如 pUC19 的多克隆位点，是一段带有多种限制性内切核酸酶单一切点的 DNA 短片段。多克隆位点位于一个基因的编码区内，这样插入失活很容易检测到。例如，该基因编码 β-半乳糖苷酶（一种与乳糖代谢有关的酶）（见 8.5 节和 8.7 节），当一种特殊的物质加入到培养基中，由于酶的活性会导致蓝色产物的生成。因此，如果细胞中的 pUC19 不含克隆 DNA（β-半乳糖苷酶有活性）则为蓝色的菌落，而细胞含有的质粒带有克隆的 DNA（β-半乳糖苷酶失活）菌落则没有颜色。这样通过检查就可以选到克隆有 DNA 的菌落。这些颜色筛选特征在噬菌体克隆载体中也存在，一个特别的例子在 15.1 节讨论，可见图 15.1。

有时插入失活可通过选择鉴别而不是筛选。例如，在一些载体中，携带多克隆位点的基因产生对宿主致命的产物，这样，只有该基因被插入灭活的细胞才能生长，可作为

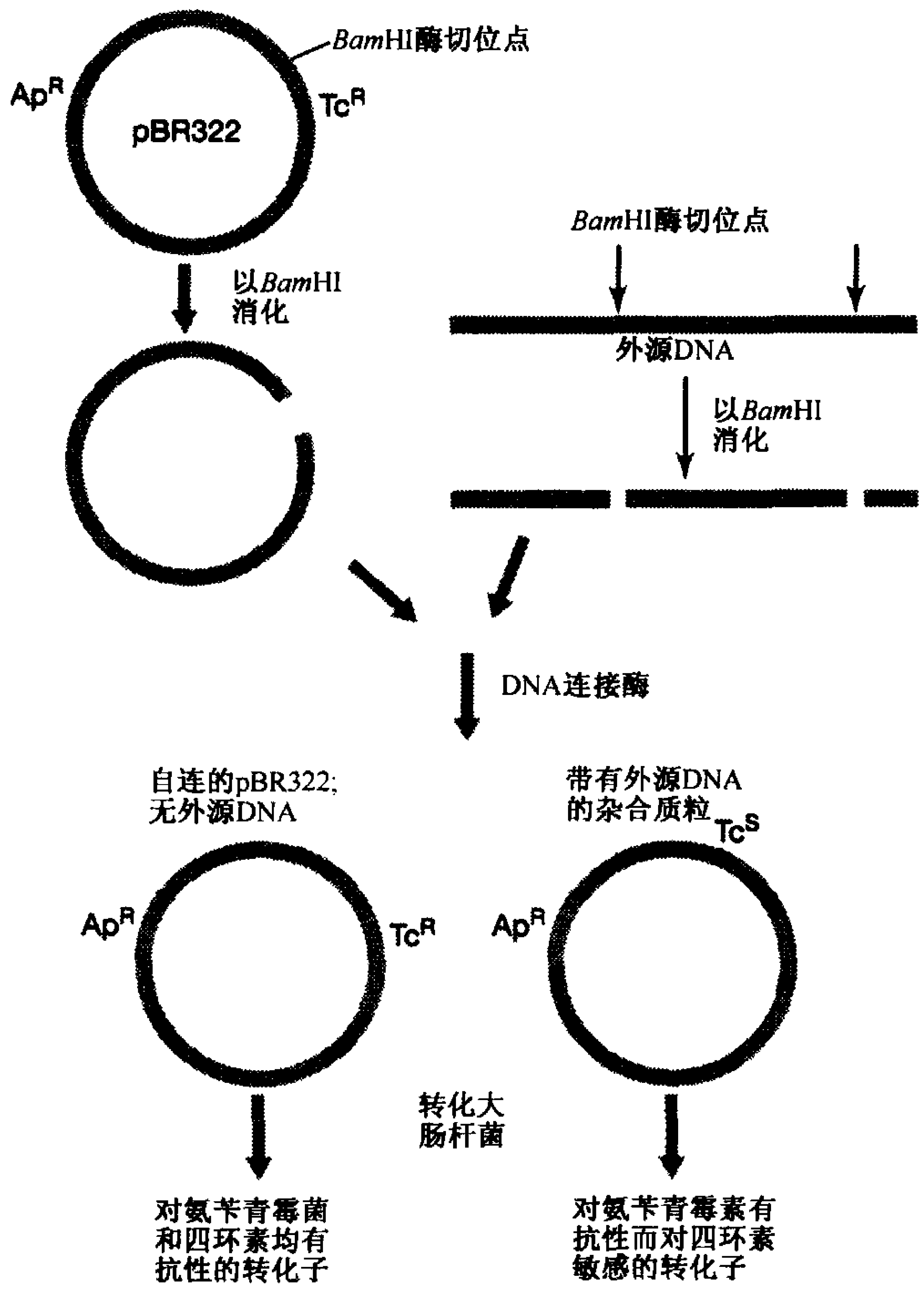


图 10.37　利用 pBR322 质粒克隆。用 pBR322 作克隆载体，显示如何插入外源 DNA 而使四环素抗性基因失活，从而易于鉴别出携带克隆 DNA 片段的转化子。

非常严格的选择工具。

在基因工程中，以质粒作载体是很普遍的，特别是克隆片段较小时。有时用于克隆载体的质粒也希望用于目的基因的表达，因为在特殊的条件下，调节基因也可以被连接到质粒上，而使克隆的基因表达（见 31.4 节）。

概念检查

质粒便于分离、提纯，在细菌细胞中易于获得高拷贝，因此是有用的克隆载体。利用质粒的抗性基因可以选择出携带质粒的细菌细胞。

◆ 解释在克隆时为什么必须使用在质粒载体上只有单一酶切位点的限制性内切核酸酶?

◆ 什么是插入失活?

10.17 作为克隆载体的λ噬菌体

如前所述，在噬菌体特异性转导过程中（见10.8节），宿主细胞的部分基因会进入噬菌体基因组。λ噬菌体就是一种特异性转导噬菌体（见9.11节）。在特异性转导过程中，它作为载体，但这种重组发生在细胞内而不是试管中。在体外重组中，λ噬菌体同样可作为克隆载体。

λ噬菌体的生物学背景已全部清楚，它可作为分子克隆中强有力的工具。λ噬菌体可携带的外源DNA片段要比质粒所能携带的更长，而且外源DNA可以很高的效率在体外被包装进噬菌体颗粒。以这些噬菌体颗粒感染适当的宿主，效率要高于转化（传染）。λ噬菌体具有大量的基因和复杂的遗传图谱（图9.18）。其作为克隆载体最有意义的是，在λ噬菌体基因组中部的1/3，即基因J到基因N之间是与感染无关的非必需区，这一部分可被外源DNA取代（图10.38）。这样可使相对大的DNA片段克隆进λ噬菌体，最大可达20kb，是其他小质粒载体如pBR322克隆能力的2倍。

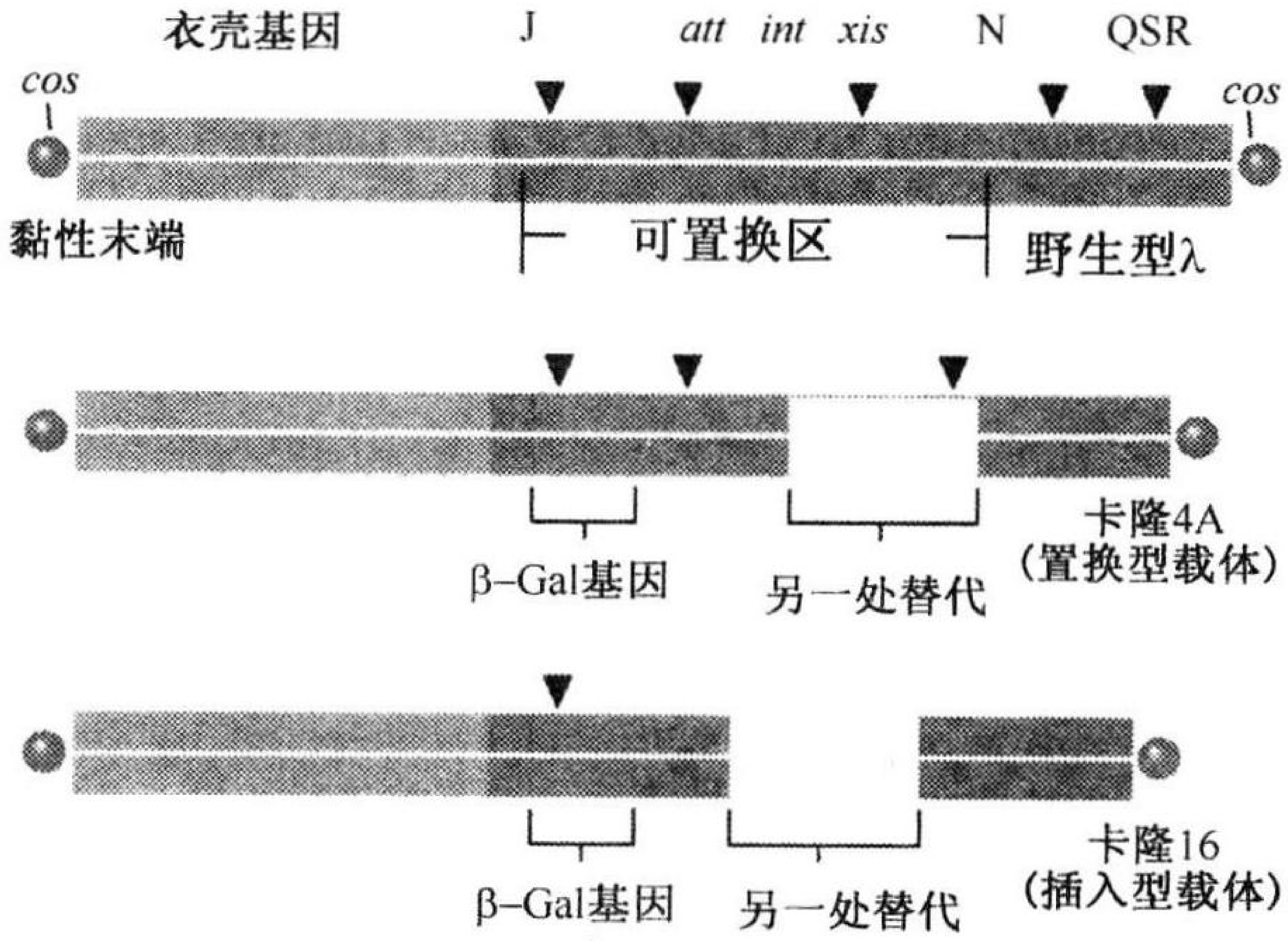


图10.38 利用λ噬菌体的分子克隆。图示为缩短的λ噬菌体遗传图，用圆圈代表黏性末端（图9.18a）。卡隆4A和卡隆16都是λ噬菌体的衍生体，它们都是经过对非必需区的置换和删除所得到的。其中的一个置换基因是β-半乳糖苷酶基因（*lacZ*），利用这一基因可进行对克隆的选择。野生型λ基因组为48.5kb，卡隆4A和卡隆16的长度分别为45.4kb和41.7kb，箭头指示*Eco*RⅠ的酶切位点。

修饰的λ噬菌体

野生型λ噬菌体带有过多的限制性内切核酸酶位点，因此不适合于作为克隆载体。为此，人们构建了许多适合克隆的修饰λ载体以克服此缺陷，卡隆噬菌体（Charon phage）系列就是其中之一。在卡隆噬菌体中，通过突变去除了不需要的限制酶切位点。如Charon16，含有各种限制酶的单一切点，这些位点都可插入外源片段。相反，如Charon4A则含有各种限制酶的两个切点，这样外源DNA可替代λ噬菌体的某一片段（图10.38）。后一种载体称为置换型载体（replacement vector），常用于克隆大片段DNA。Charon4A被用作置换型载体，在克隆过程中内部两个小的片段被切除掉。

两种质粒均带有报告基因，如 β-半乳糖苷酶基因。当用这些载体感染大肠杆菌 Lac^- 菌株时，随着载体上基因的表达，会产生 β-半乳糖苷酶。利用颜色反应平板可将 Lac^+ 噬菌斑挑出（见 15.1 节）。如果一外源基因插入 β-半乳糖苷酶基因，则 Lac^+ 表型消失，无色的 Lac^- 噬菌斑很容易从有颜色的噬菌斑中捡出（图 15.1）。

λ 载体克隆步骤

用置换型 λ 载体克隆包括以下步骤（图 10.39）：

（1）从噬菌体颗粒中分离出载体 DNA，用适当的限制酶切割。

（2）用 DNA 连接酶将外源 DNA 与两个 λ 片段连接到一起，连接后的分子长度要在 λ 噬菌体颗粒可包装的范围内。

（3）加 λ 噬菌体头部、尾部蛋白质，进行体外包装，自发形成有活性的噬菌体颗粒。

（4）感染大肠杆菌，通过挑选噬菌斑而分离噬菌体克隆。

（5）利用核酸杂交、DNA 测序或遗传性状检测选出携带外源 DNA 的重组噬菌体。

就选择重组子而言，置换型 λ 载体要比质粒载体更为方便。这是因为：①λ 噬菌体转移重组 DNA 的效率高；②未连接外源 DNA 的 λ 片段过小，不能被包装成为噬菌体颗粒，因此，活的噬菌体颗粒都含有克隆 DNA。

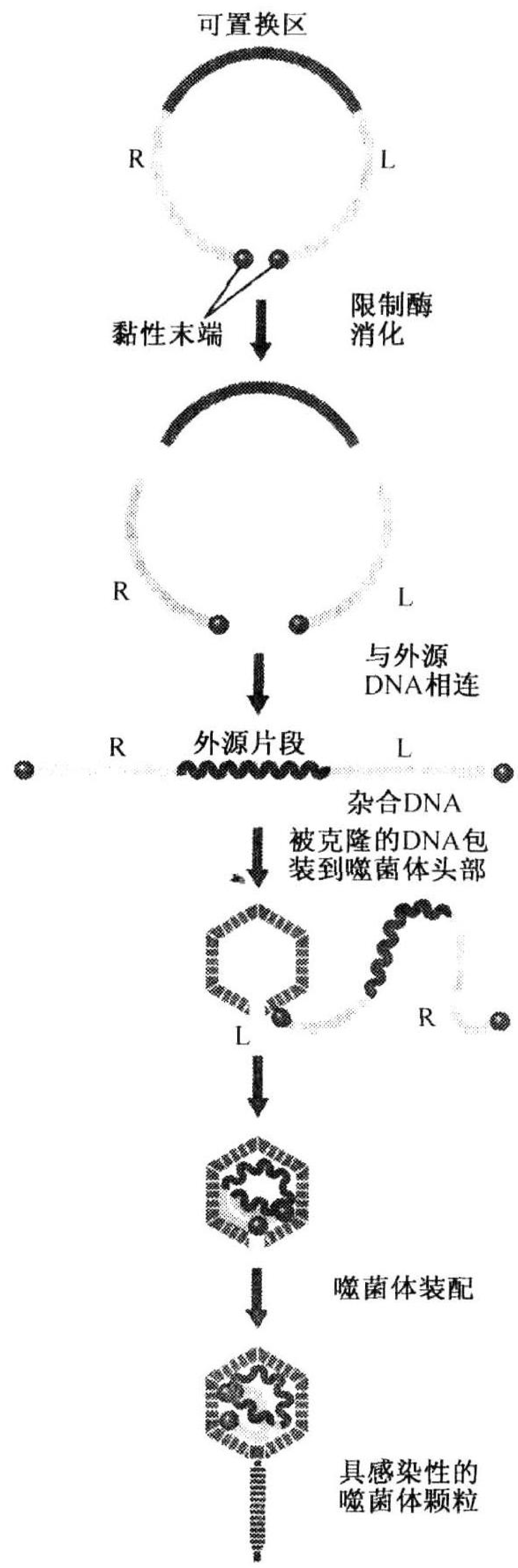


图 10.39　以 λ 噬菌体为克隆载体。插入 DNA 最大片段为 20kb。

黏粒

与置换型 λ 载体类似，黏粒（cosmid）构建使用了特殊的 λ 基因，它是由携带外源 DNA 的质粒加上 λ 噬菌体的 *cos*（黏性末端）位点构成的（见 9.11 节）。*cos* 位点是 λ 颗粒包装 DNA 所必需的。经过修饰的质粒就可在体外包装成为完整的噬菌体颗粒，进而转导大肠杆菌。黏粒的结构使其不必采用转化进大肠杆菌这一低效率的方法（见 10.7 节）。

黏粒的一个显著优势是可以用来克隆大片段 DNA，可允许最大插入 50kb。因此，插入片段大，可减少了构建整个基因文库所需的克隆数。黏粒的另一优势是能够取代质粒以噬菌体形式保存 DNA。噬菌体颗粒要比质粒稳定得多，因此，重组 DNA 可保存很长时间。

概念检查

λ噬菌体经修饰后形成了许多易于使用的克隆载体。与多数质粒载体相比，λ可克隆更多的外源DNA。另外，外源DNA经体外包装后的转移具有更高的效率。具有λ*cos*位点的质粒载体称为黏粒，它们可以携带很大的外源DNA片段。

◆ 为什么体外重组DNA包装的能力十分有用?

◆ 什么是置换型载体?

10.18 体外定点诱变

体外DNA操作技术为诱变开辟了新的领域，在体外诱变中，了解比较清楚的是定点诱变（site-directed mutagenesis）。传统的诱变（见10.3节）是对有机体随机的诱变，而定点诱变则在试管中利用合成DNA或重组DNA技术，精确地在基因特定位点进行诱变。

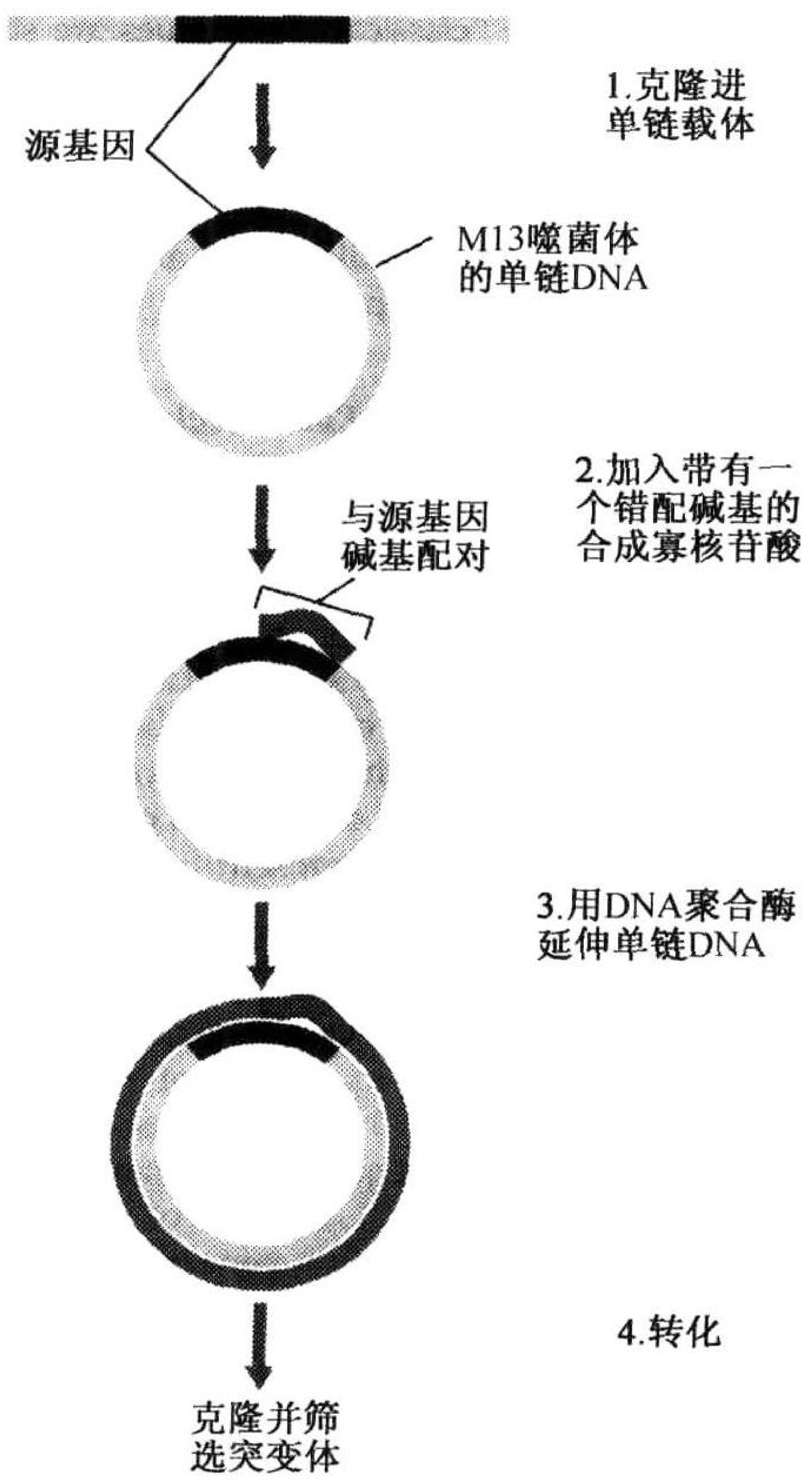


图10.40 利用合成的寡脱氧核苷酸片段进行定点诱变。注意克隆的M13噬菌体，产生单链DNA用于定点诱变。

定点诱变

定点诱变是有力的工具，可允许操作者改变特定基因的任意碱基。定点诱变的基本过程是：先合成一小段DNA寡聚核苷酸引物（见7.8节），在这段核苷酸上带有我们期望的碱基变化，使这段寡核苷酸与目的基因的单链DNA配对，除了修改过的一小段，其他碱基配对是完全的。接下来用DNA聚合酶延伸这段合成的寡核苷酸单链片段，得到该基因完整的双链DNA。将这些双链DNA转化进宿主细胞，通过某种阳性选择法选出突变株，如抗生素抗性（这种情况下改变的基因应该带有抗生素抗性标记），获得的突变株用于生产被修饰过的（突变）蛋白质。

定点诱变的过程见图10.40。一般情况下先将目的基因克隆到单链DNA载体上，突变的DNA通过互补配对与目的基因结合（图10.40）。广泛应用的单链DNA载体是M13噬菌体，其基因组易于操作并可以在大肠杆菌中复制（见16.3节）。利用M13可进行几种基本的克隆操作，其作为克隆载体用于基因组分析将在15章进行讨论。

定点诱变可以用来检验蛋白质上已知的氨基酸被替代后的效果。例如，如果某人想要研究酶的活性位点以确定这一区域内特定氨基酸的重要性，就可以用定点诱变改变特定的氨基酸，检验修饰后的酶的效果并和野生型的酶进行比较。在这个实验中，带有突变 DNA 的载体将被转入产生正常酶的突变菌株，在这种情况下，酶的活性就只与由定点诱变产生的氨基酸相关了。

利用定点诱变，酶学家可连接酶的任何活性部分，如催化作用、对物理或化学剂的抗性或敏感区、与其他蛋白质相互作用区及蛋白质中的特异氨基酸。尤为重要的是，定点诱变可使酶学家获得详细的资料，去解释哪些氨基酸对酶的功能至关重要，并深入认识酶是如何催化化学反应的。

盒式诱变及基因破坏

由于大量限制性内切核酸酶已商业化，很多不同的 DNA 序列均可被切割，因此，就有可能在目的基因内发现若干不同的限制位点。如果基因内没有合适的酶切位点或在所需位置无切点，可利用定点诱变插入这些切点（图 10.40）。如果两限制酶切位点比较近，其间的 DNA 片段可被切除，并以一段合成 DNA 取代其位置，当然在这段 DNA 内的一个或几个核苷酸已经过修改，这种合成的片段称为盒（或弹夹），该过程称为盒式诱变（cassette mutagenesis）。

利用盒在单一位点的插入，会导致插入突变。当以盒取代基因片段时，通常盒的大小与所取代片段的大小相同，而且用于插入突变的盒可以是任意大小，甚至是一个完整的基因。实际上，为易于选择，常使用具有抗药性基因的盒，以便使宿主产生相应的表型，这种类型的盒式诱变过程称为基因破坏（gene disruption）。

基因破坏的过程见图 10.41。在这个实验中，一段具卡那霉素抗性的片段，称为 kan 盒，被插入一个克隆基因的限制性位点。之后，用另一限制酶切割带有此突变基因的质粒，产生线性 DNA。将这段线性 DNA 转化进宿主，利用卡那霉素抗性进行选择。由于线性质粒不能复制，因此只有当质粒上的突变基因与染色体上的野生型基因发生同源重组时（见 10.6 节），细胞才能生长。

注意当插入盒的时候，细胞在获得卡那霉素抗性的同时，也失去了 kan 盒所插入基因的活性。因此，这种突变称为敲除突变（knockout mutation）。这一过程与筛选转座子引起的插入突变相似（见 10.14 节），与之不同的是遗传学家可以精确地选择希望突变的基因。在对单倍体细胞（原核生物）进行敲除突变的实验中，只有当被破坏的基因是非必需基因时，细胞才有可能存活。因此，这种实验可作为判断某一基因是否是必需基因的一种方法。

概念检查

在体外可以合成具有所需序列的 DNA 分子，这段 DNA 可直接用于构建突变基因或通过定点诱变改变某一基因的特定碱基。利用称为盒的插入 DNA 片段也能够破坏基因。插入的盒在使野生型基因失活的同时，还赋予了细胞一定的选择标记。

◆ 酶学家如何利用定点诱变？

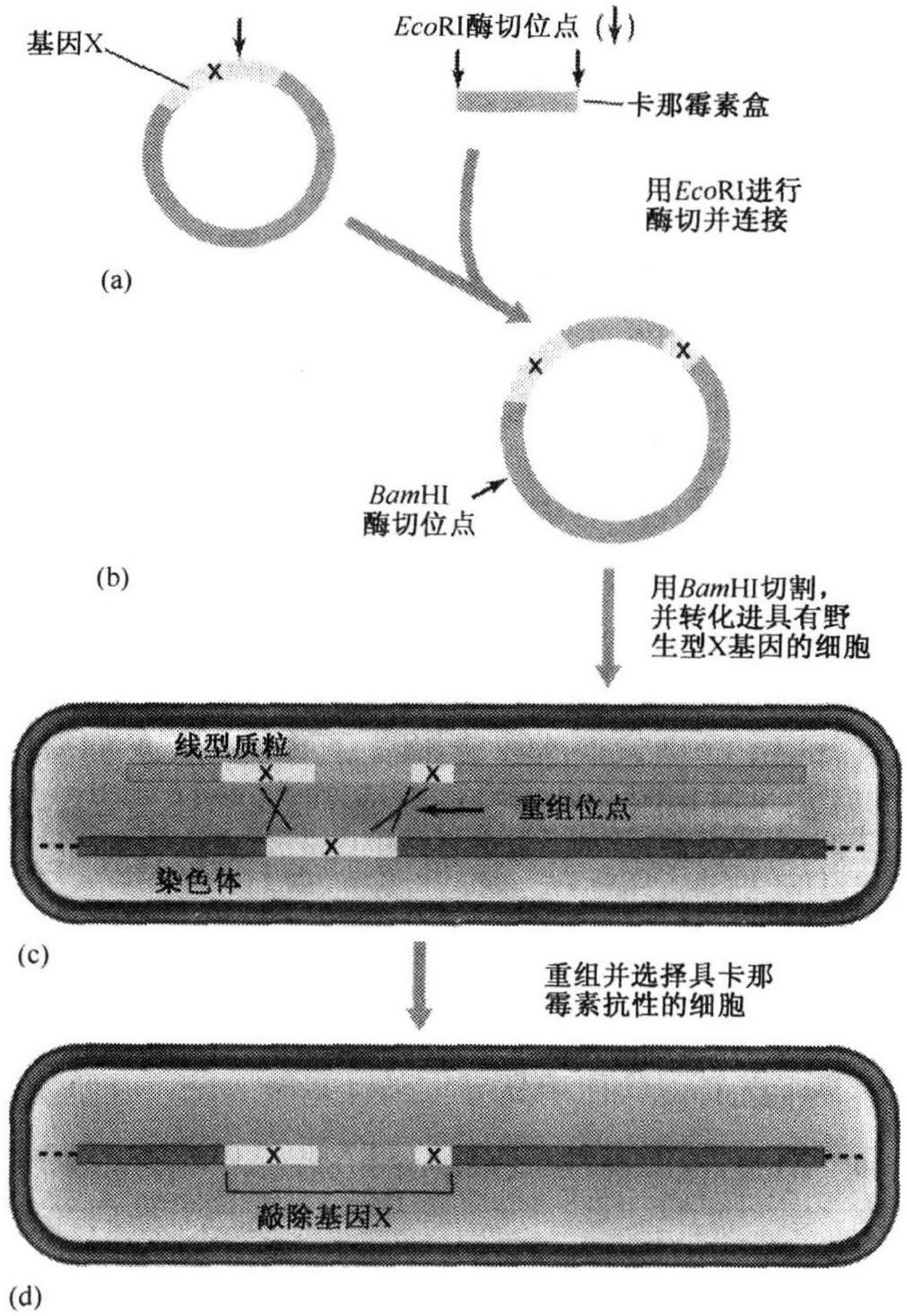


图 10.41　利用盒式诱变进行基因破坏。(a) 用 *Eco*R Ⅰ 切割带有野生型 X 基因的质粒，与 DNA 片段（kan 盒）混合。这一 DNA 片段带有卡那霉素抗性基因，也用 *Eco*R Ⅰ 切割。切割后的质粒与 DNA 片段连接。(b) 连接产物是一个质粒，质粒上带有因 kan 盒插入而失活的 X 基因。将这个质粒再用 *Bam*H Ⅰ 切割，转化进带有野生型 X 基因的细胞。(c) 转化的细胞带有插入失活的 X 基因的线性质粒，还存在着自身染色体上野生型 X 基因。有的细胞突变的基因与野生基因会发生同源重组（图 10.9）。(d) 由于线性质粒不能复制，只有 kan 盒重整进宿主染色体的细胞才能在有卡那霉素存在的条件下生长。这些细胞只含有一个拷贝的被破坏的 X 基因，这种破坏通常会使 X 基因完全失活。

◆ 什么是敲除突变？

Ⅳ 细菌染色体

本章描述过的 3 种遗传交换机制即转化、转导、接合都是基因克隆的有效工具，均可用于细菌染色体上各基因位点的作图。大肠杆菌的基因作图主要利用接合。利用不同转移起始位点的 Hfr 菌株（图 10.25），才可能绘制出完整的细菌基因图。接合实验不

能为紧密连锁的基因排序，大肠杆菌染色体精细结构图的绘制是用普遍性转导方法完成的。P1 噬菌体可以携带小的 DNA 片段，因此对于大肠杆菌基因的详细作图很有用。

用于其他原核生物染色体作图的遗传学技术已经检测出，利用这些技术在特定的机体中会发生基因转移。例如，大肠杆菌的转化效率很低，但在 G^+ 细菌中却非常高效（见 10.7 节）。因此，转化为芽孢杆菌基因作图提供了有效的工具。除了接合，转导也被用于大肠杆菌染色体作图。然而，由于转导转移的基因远远少于接合，故仅用于基因精细结构的作图。

尽管这些经典的技术在鉴定和构建菌株中仍被使用，但在构建遗传图谱时它们已被分子克隆和 DNA 测序技术所代替。克隆和测序已经革新了原核和真核生物基因组的研究，我们将在第 15 章讨论基因组。

10.19 大肠杆菌染色体的遗传图谱

图 10.42 显示的是大肠杆菌 K-12 菌株的遗传图谱。图距单位用转移的分钟表示，全部染色体为 100min，“0”时是任意设定的，它是最早发现的 Hfr 菌株转移的第一个基因（苏氨酸操纵子）。

图 10.42 只显示了大肠杆菌染色体数千个基因中很少一部分，以及一些限制性内切核酸酶的识别位点。染色体大小可用分钟（由最初接合研究所确定的单位）和千碱基对（kb）表示。像很多其他原核生物一样，大肠杆菌的染色体已经全部完成测序。像 3Mb 或 4Mb 的相对较小的细菌染色体序列，可以用常规方法，随机鸟枪法克隆后自动测序（见 15.2 节）。由于有了这么多的基因组分析的遗传信息，必须通过计算机管理这些资料。由此就产生了分子生物学的一个新领域——生物信息学（bioinformatics）（第 15 章）。用有力的基因搜索软件分析数据，已将生物信息学这一领域放在了基因组研究的核心位置。

大肠杆菌作为原核生物的模式

很多特征决定了大肠杆菌可作为研究生物化学、遗传学和细菌生理学的重要材料。正如第 9 章和第 16 章中强调的，甚至大肠杆菌病毒也成了研究的模式系统。因此，尽管大肠杆菌染色体并不是原核生物染色体中最早被测序的，其在微生物中仍最具特色。大肠杆菌除了作为模式生物，也广泛地用于基因工程的研究和应用（第 31 章）。

大肠杆菌 MG1655 菌株最早被测序，该菌株由大肠杆菌 K-12 衍生而来，K-12 是用于遗传学研究的传统菌株。野生型的大肠杆菌 K-12 是 λ 噬菌体的溶原性细菌（见 9.11 节）并带有 F 质粒（见 10.9 节）。然而菌株 MG1655 在测序前已经去掉了 F 质粒（利用吖啶处理，见 10.9 节）并不再为溶原 λ 噬菌体（利用辐射）。MG1655 菌株的染色体含有 4 639 221bp。基因组序列分析显示大约有 4200 个功能性可读框，占基因组的 88%。基因组中 1%的基因编码 tRNA 和 rRNA，还有 0.5%没有编码功能的重复序列。剩下基因组的 10%包括所有的调控序列：启动子、操纵子、DNA 复制的起始和终止序列等。

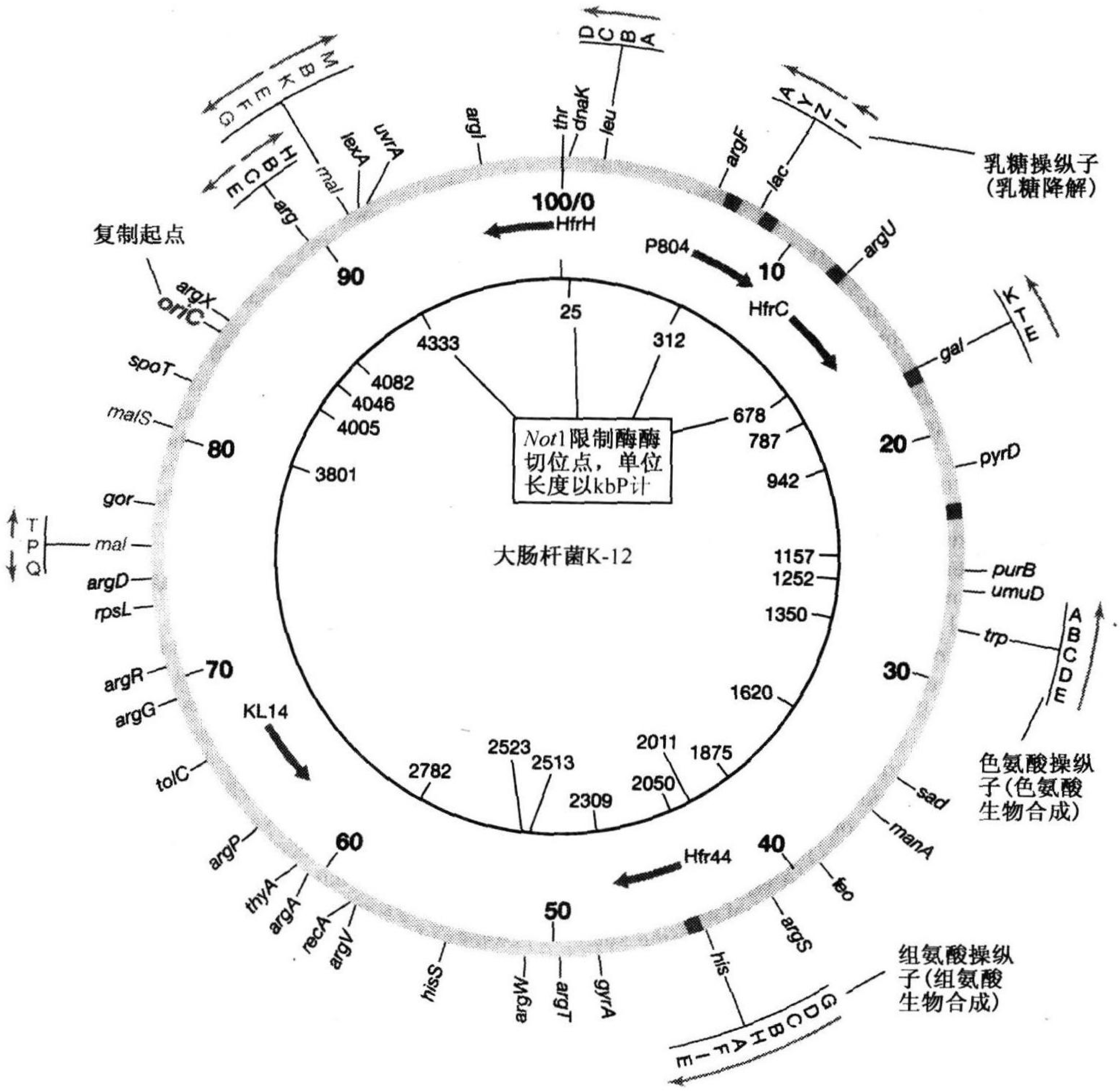


图 10.42　大肠杆菌 K12 菌株染色体的环形连锁图。图的外圈示部分基因位点。大肠杆菌实际的可读框（ORF）是 4288 个，染色体含有 4 639 221bp。图中标出几个操纵子，箭头所指为转录方向。外圈内从 0～100 的数字示以分钟表示的位置。*ori*C（84.3min）表示 DNA 复制起点，从这点开始进行双向复制（见 7.6 节和图 7.16～图 7.20）。内环的数字是以 kb 表示的座位，均为限制性内切核酸酶 *Not* Ⅰ 的识别切割片段。注意 0min 及 0kb 位点依惯例表示 *thr* 座位。图示了几种 Hfr 菌株的转移的起点和方向（箭头）。5 个蓝色位点表示可转座因子 IS3 的 5 个拷贝所在的位置，它在 F 质粒上有 2 个拷贝，IS3 与 Hfr 的形成有关（见 10.12 节）。红色位点表示 λ 原噬菌体的整合位点（见 9.11 节）。如 λ 整合进染色体，图的长度将增加 48.5kb（仅超过 1min）。麦芽糖调节子（见 8.6 节）用绿色表示，包括了几个操纵子，这一调节子的多数基因均以 *mal* 缩写表示，注意还有一个基因 *lamB*，它编码将麦芽糖送入细胞的一种膜蛋白，但这一蛋白质同时也作为 λ 噬菌体的受体。基因 *rps*L（73min 处）编码核糖体蛋白，这一基因曾经也称为 *str*，因为此基因突变导致对链霉素的抗性。

大肠杆菌染色体基因的排列和表达

早期的作图实验和对大肠杆菌中控制单一生化途径中酶的调节基因的研究，显示出

大部分的基因都是成簇的。在图10.42的遗传图上，标出了一些基因簇。例如，*gal*基因簇在18min处，*trp*基因簇在28min处，*his*基因簇在44min处。这些基因簇都含有转录一个多顺反子mRNA的操纵子（见7.13节和10.13节）。

大肠杆菌中一些生化途径的基因不是成簇的。例如，合成精氨酸的基因（*arg*）以及*arg*调节子就是分散在染色体中的（见8.6节）。由于早期发现的是多基因操纵子，可作为研究基因调控的模型，例如，*lac*操纵子（见8.5节和8.7节），一般人们会觉得在原核中都是以操纵子的形式存在的。然而大肠杆菌染色体的序列分析显示，在2584预期或已知的转录单位中，超过70%只有单一的基因。只有6%的操纵子编码4个或更多的多顺反子mRNA。

基因组中，不是所有的操纵子都是以一个方向转录的。大肠杆菌中，一些操纵子沿染色体一个方向进行转录，另一些则以相反的方向转录。图10.42用箭头表示了一些多基因操纵子的转录方向。基因组分析显示两条链上的操纵子数目基本相等。大肠杆菌染色体中一些高表达基因的转录方向往往和DNA复制叉移动的方向相同。两个复制叉都在原点开始，*oriC*在图10.42的84min处，双向移动到34min处的终点处（见7.6节）。基因组测序证实，所有的7个rRNA操纵子和86个tRNA基因中的53个基因的转录方向均与复制方向相同。据推测，这种高表达基因转录的排列使RNA聚合酶避免与复制叉相撞，复制叉与RNA聚合酶沿相同方向移动。

在大肠杆菌染色体完全测序之前，已鉴定出约2000个蛋白质或编码蛋白质的基因。通过对*E. coli*染色体的序列分析可知，理论上*E. coli*可编码4288个蛋白质。其中约38%蛋白质是功能未知的，或只是推测这些基因编码蛋白质。正如我们预期，*E. coli*蛋白质平均含有300个氨基酸残基，但也有很多的蛋白质比其更大或更小。由*E. coli*最大的基因编码的蛋白质应该含有2383个氨基酸残基，但这个蛋白质并没有被特征化。然而，比较基因组分析显示，巨大蛋白质与在致病性肠细菌中发现的蛋白质有很高的相似性，这些大分子蛋白质可能在感染过程中起作用。

尽管大肠杆菌几乎没有重叠基因，但通过计算机对基因组的分析显示，在进化过程中，许多编码蛋白质的基因通过基因复制而出现（见10.14节）。在大肠杆菌基因组中，一些基因群和编码相关功能蛋白的序列形成基因家族（见15.8节）。例如，一个含有70个基因的家族其产物都是与膜运输有关的蛋白质。基因家族是普遍的，并不局限一个种内，甚至跨越了分类学上的界限。这就强调了一个事实：基因重叠和水平转移是控制原核生物遗传互补的强有力机制。

大肠杆菌染色体的其他特征和测向基因转移

*E. coli*基因组含有很多其他遗传元件，这些遗传元件可自我复制。例如，基因组含有10种不同的IS，包括7个拷贝的IS*2*和5个拷贝的IS*3*（见10.14节）。这些元件在F质粒上也存在，染色体和F质粒上的IS与Hfr菌株的形成有关（见10.12节和图10.23）。*E. coli*基因组还存在一些缺陷型原噬菌体（其中的3个与λ噬菌体有关）。因此，溶原性噬菌体可能是*E. coli*生物体某一时期的一部分。

基因组分析显示，*E. coli*的至少一部分基因组是通过基因水平转移从其他生物获得的。据估计*E. coli*有20%的基因组来源于这种转移。这些水平转移的基因可被识别，

可通过与原始 *E. coli* 基因明显不同的 GC 含量，或通过它们编码蛋白质时使用明显不同于原始 *E. coli* 蛋白质的密码子（密码子偏爱性，见 7.14 节）。

水平基因转移可大规模地改变生物的基因组。例如，*E. coli* 某些株含有的毒力基因位于染色体上一段较大的、不稳定区域，这部分称为致病岛（pathogenicity island），是来自水平基因转移。有趣的是，水平基因转移并不一定产生较大的基因组。很多通过这种方式得到的基因并没有什么选择优势，常通过缺失而丢掉。这一方式长期以来便保持了某种生物染色体的大小。例如，原核生物基因组从小于 0.5Mb 到超过 10Mb 不等，但比较了几株 *E. coli*，它们的基因组都是大约 4.6Mb，说明基因组的大小具有种的特异性。

原核生物基因组的深入分析

对全基因组序列分析可得到大量的信息（第 15 章）。*E. coli* 分子遗传学的系统研究已经进行了几十年，其基因组也完成了全部测序，这是否意味着大肠杆菌进一步的研究只能依靠计算机，而传统的遗传学和生化研究已经结束了吗？显然不是。尽管计算机对序列分析可以获得更多信息，但要知道基因的功能，尤其是调控基因的序列，仍然需要分离突变株、对突变体作图、用生物化学和生理学分析来确定这些突变对机体的影响。事实上，基因组分析显示，仍有 20%～40%（依赖不同的种）的基因被认定属于编码“功能未知的蛋白质”（第 15 章）。

这些数目巨大未知功能的蛋白质蕴藏着新的生化秘密，将大大扩充原核生物已知的代谢知识（第 15 和第 17 章）。另外，由于原核生物基因与真核生物包括人的基因有很高的同源性，充分了解原核生物基因的功能将为更好地了解人类遗传学奠定基础。很多人类疾病都有遗传联系，正因为如此，我们对细菌蛋白质了解的越清楚，越能够理解它们在人类机体中的功能。这也能指导人类去开发新的药物和治疗方法来控制疾病。

概念检查

用接合、转导、分子克隆和测序对 *E. coli* 染色体进行了作图。*E. coli* 一直作为非常有用的模式生物，从中已获得大量的信息。这些信息不仅包括基因结构，还包括基因功能及调控。

◆ 原核生物染色体遗传图的绘制一般只用分子克隆和 DNA 测序的方法。而在 *E. coli* 中为什么还用到其他方法？

复习题

1. 分别用一句话定义基因型和表型。当生物的基因型发生变化时表型是否发生相应变化？为什么？若无基因型变化，表型能变化吗？请举例解释上述两种答案。（见 10.1 节）
2. 试解释为什么大肠杆菌 His^- 为营养缺陷型而 Lac^- 却不是。（提示：大肠杆菌的乳糖和组氨酸代谢分别是用来做什么的？）（见 10.1 节）

3. 什么是沉默突变？根据你对遗传密码的了解，试解释为什么沉默突变多发生在密码子的第 3 个位点上？（见 10.2 节）
4. 发生在启动子中的微插入并非移码突变。解释名词：微插入、移码、突变和启动子（见 7.10 节）。正确地描述这些术语。（见 10.2 节）
5. 说明同一基因的第二次移码突变如何校正其第一次移码突变。（见 10.2 节）
6. 细胞的平均突变率是多少？这个突变频率可以改变吗？（见 10.3 节）
7. 分别以一种生物、一种化学诱变剂和一种物理诱变剂为例说明诱变机制。（见 10.4 节）
8. 利用细菌检测的埃姆斯试验与人类癌症有何关系？（见 10.5 节）
9. 同源重组与点特异性重组有什么不同？（见 10.6 节）
10. 为什么在一次转化或转导实验中很难将多种基因转入受体细胞？（见 10.7 节和 10.8 节）
11. 为什么将引起普遍性转导噬菌体称为转导颗粒，而将引起特异转导的噬菌体称为转导病毒（或转导噬菌体）？（见 10.8 节）
12. 质粒是如何复制的？它与染色体复制有什么不同？（见 10.19 节）
13. 什么是 R 因子？为什么 R 因子与医学有关？（见 10.10 节）
14. 什么是性菌毛？F^- 和 F^+ 哪种细胞能产生这一结构？（见 10.11 节）
15. F^+ 细胞在转移染色体基因组之前需要先做什么？（见 10.12 节）
16. 什么是“反式”突变的互补？（见 10.13 节）
17. 为什么用转座子诱变后分离细菌突变型时，那些含有抗生素抗性基因的转座子最有用？（见 10.14 节）
18. 克隆载体的基本特征是什么？质粒的什么特征使其成为分子克隆的常用载体？F 质粒的哪些特征不利于其体外应用？（见 10.15 节和 10.16 节）
19. 如果用抗生素抗性基因的插入失活来发现含有外源 DNA 的质粒，为什么都希望在质粒载体上能有两个抗生素抗性基因？（见 10.16 节）
20. 利用病毒载体比质粒载体有哪些优点？（见 10.17 节）
21. 哪些研究用定点突变可以完成，而用一般的突变无法完成？（见 10.18 节）
22. 大肠杆菌染色体有多大？大约编码多少种蛋白质？在大肠杆菌染色体上存在多少非编码 DNA？（见 10.19 节）

应用题

1. 组成型突变是指菌株能不断合成一种蛋白质，而野生型需要诱导。举出导致组成型突变的 DNA 分子变化的两种方式，并指出如何用遗传学方法区别这两种组成型突变？
2. 由第 7 章的知识可见核糖体发生易位对细胞是很危险的，因为核糖体的精确定位对于保持正确的可读框至关重要。而在某些情况下核糖体在 mRNA 上会发生周期性的移码错误，试比较这种错误与同一基因上的移码突变对细胞的影响。
3. 尽管目前已发现了许多种化学诱变剂，但没有一种能诱发单一基因突变（基因特异

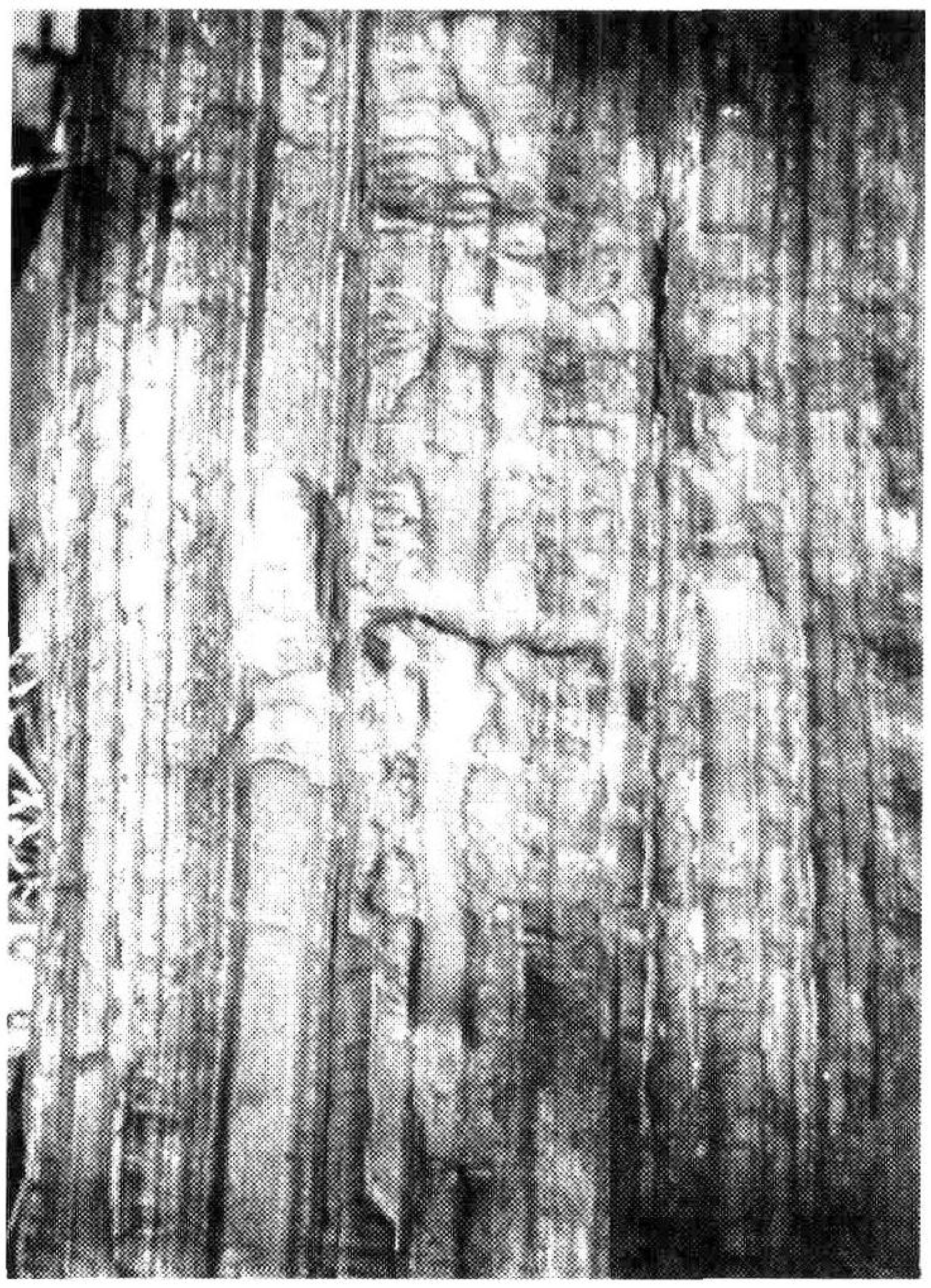
性诱变剂)，根据你对诱变剂的了解，试解释为什么找不到一种基因特异性的化学诱变剂。定点突变是如何做到的?

4. 转座因子插入基因时会引起突变。这些因子打断了基因的连续性。同样也可以说内含子（见 7.13 节）打断了基因的连续性，却不影响基因的功能。为什么内含子的存在不使基因失活，而转座因子却使其失活呢?
5. 在使用质粒载体 pUC19 时，需要限制性内切核酸酶 *Bam*H Ⅰ 的切割，使 β-半乳糖苷酶基因失活，得到 DNA 片段。在使用 pBR322 时，克隆相同的片段使四环素抗性基因失活。两个载体都含有氨苄青霉素抗性基因用来选择重组分子。为什么 pUC19 比 pBR322 作为克隆载体更有效?（提示：容易找到带有克隆 DNA 载体的细胞。图 15.1 也能为你提供答案。）

（陈月华　译，李明春　校）

11

微生物进化和系统学



原核生物的进化历史反映了地球本身的进化历史。在地球存在的 45 亿年间，有 4/5 的时间是原核生物的繁盛时期。原核生物原始性的证据以多种形式存在，包括广泛分布于地球上的氧化铁的形成。

词汇表

等位基因（alelle）：某一给定基因的一种形式

古生菌（*Archaea*）：与细菌不同的一类系统发育相关的原核生物

细菌（*Bacteria*）：与古生菌不同的一类系统发育相关的原核生物

双名法（binomial system）：林奈提出的一个命名生物的系统，它规定每个生物有一个属名和一个种加词

域（domain）：分类学意义上生物分类的最高水平

生态型（ecotype）：一个在遗传上完全相同但是在同一生态位上享有独特资源的群体

内共生（endosymbiosis）：该理论认为线粒体和叶绿体最初是自由生活的细菌，并能在原始细胞中稳定存在，最终产生了现代的真核细胞

真核生物（*Eukarya*）：包括所有的真核细胞：藻类、原核生物、真菌、黏菌、植物和动物细胞

进化计时器（evolutionary chronometer）：一个像核糖体 RNA 一样的分子，其序列能相对衡量进化趋异性

进化距离（evolutionary distance）：在系统发育树上，将生物体分隔开的物理距离的总和；进化距离与进化相关性成反比

FAME（fatty acid methyl ester）：脂肪酸甲酯

科（family）：生物分类中一个中间水平的分类等级。科含有几个属，每个属含有一个或多个种

FISH（fluorescent *in-situ* hybridization）：荧光原位杂交

GC 碱基比（GC ratio）：在生物体的 DNA（或 RNA）中，鸟嘌呤和胞嘧啶占总核酸量的比值

基因组杂交（genomic hybridization）：是一个实验性地确定基因组相似性的方法，通过衡量两种生物基因组 DNA 杂交的程度来确定

属（genus）：不同种的集合，其中的每一个种拥有一项或多项（通常是几项）主要特征

侧向（水平）基因转移［lateral（horizontal）gene transfer］：同一个微生物群落中细胞间的基因转移

后生动物（metazoa）：多细胞生物

多位点序列分型（multilocus sequence typing）：一个生物分类学的工具，基于对 6～7 个持家基因的比较

细胞器（organelle）：真核细胞内发现的相当于细菌大小的由单位膜封闭的结构，具有独特的代谢功能

系统发生探针（phylogenetic probe）：一段与一些核糖体 RNA 特征序列互补的寡聚核苷酸，有时染色使其能发出荧光

系统发生（phylogeny）：生物体的进化史

门（phylum）：三大生命领域之一的一个主要的细胞系

变形细菌（proteobacteria）：一大类与系统发育相关的革兰氏阴性菌

核糖体数据库工程（RDP）（ribosomal database project）：小亚基核糖体 RNA 序列的大型数据库，能查询并能用于进行比较核糖体 RNA 序列的研究

核糖体分型（ribotyping）：是一种能通过经限制性内切核酸酶消化 16S rRNA 的基因后所得到的片段进行微生物鉴定的方法

RNA 生命（RNA life）：一种可能的存在于早期地球上，缺少 DNA 和蛋白质的生命形式，RNA 行使其遗传编码和催化两种功能

特征序列（signature sequence）：在特定生物或一类系统发育相关的生物中，16S rRNA 或 18 S rRNA 中所具有的寡核苷酸特定序列。

16S 核糖体 RNA（16S ribosomal RNA）：行使原核生物小亚基功能的多核苷酸（约含 1500 个碱基）；能从 16S rRNA 序列获得进化信息；真核生物的对应物是 18S rRNA

小亚基 RNA（small subunit RNA，SSU RNA）：来自原核生物 30S 核糖体或者真核生物 40S 核糖体亚基的核糖体 RNA

种（species）：微生物学中多个菌株的集合，这些菌株具有相同的主要特征，但它们在一个或多个重要特征上与其他菌株的集合不同

叠层石（stromatolite）：是典型的由丝状微生物和其他微生物形成的分层微生物垫，这些微生物都能形成化石

分类学（taxonomy）：对生物进行鉴定、分类和命名的科学

通用系统树（universal phylogenetic tree）：能显示所有领域典型代表生物位置的系统发育树

I 早期地球、生命起源和微生物多样性

所有生物学中的一道综合题目就是进化（evolution）。在此我们开始关于微生物多样性问题的阐述，这种多样性是近 4 亿年进化的结果。本章的焦点是使微生物进化、原核生物系统发育图与其分类等级如何保持一致。我们将会看到人们怎样去理解微生物之间分子生物学的进化关系及微生物种的概念。本章可看作是背景知识，随后 4 章我们讨论本章提到的生物及其基因组。

11.1 地球的进化和早期生命形式

最初的几节我们回顾了从地球出现细胞之前到现代真核细胞的整个时期。我们将会知道，无生命时期的化学反应提供了生命起源的先决条件，早期“生命形式”的自我复制可能在胞外进行，早期能源可能是无机的，以及真核细胞至少是由两种不同生物组成的遗传嵌合体。

地球的起源

地球本身大约已经存在了 46 亿年。太阳系是这样形成的：一个极热而巨大的星球爆炸后，产生了一个新的星球——太阳及太阳系的其他成员。虽然还没有发现属于我们行星起源的岩石，也许因为它们已经被风化，但是却在地球上的几个地方发现了大约 40 亿年前的岩石。已经发现的最古老的岩石是 Itsaq 片麻岩复合物，在格陵兰岛的西南部，它们可追溯到大约 38.6 亿年前。其他的原始岩石包括 Warrawoona 系列、Towers Formation、西澳大利亚的早期 Archaean Apex Basalt 和非洲南部的 Swaziland 系列，以上这些岩石大约有 35 亿年历史（图 11.1）。

原始岩石有三种类型：沉积岩、火山岩和碳酸岩。最早的沉积岩具有特殊的进化意义，因为沉积岩的形成需要液态水。因此，既然沉积岩在地球上大约存在了 40 亿年，

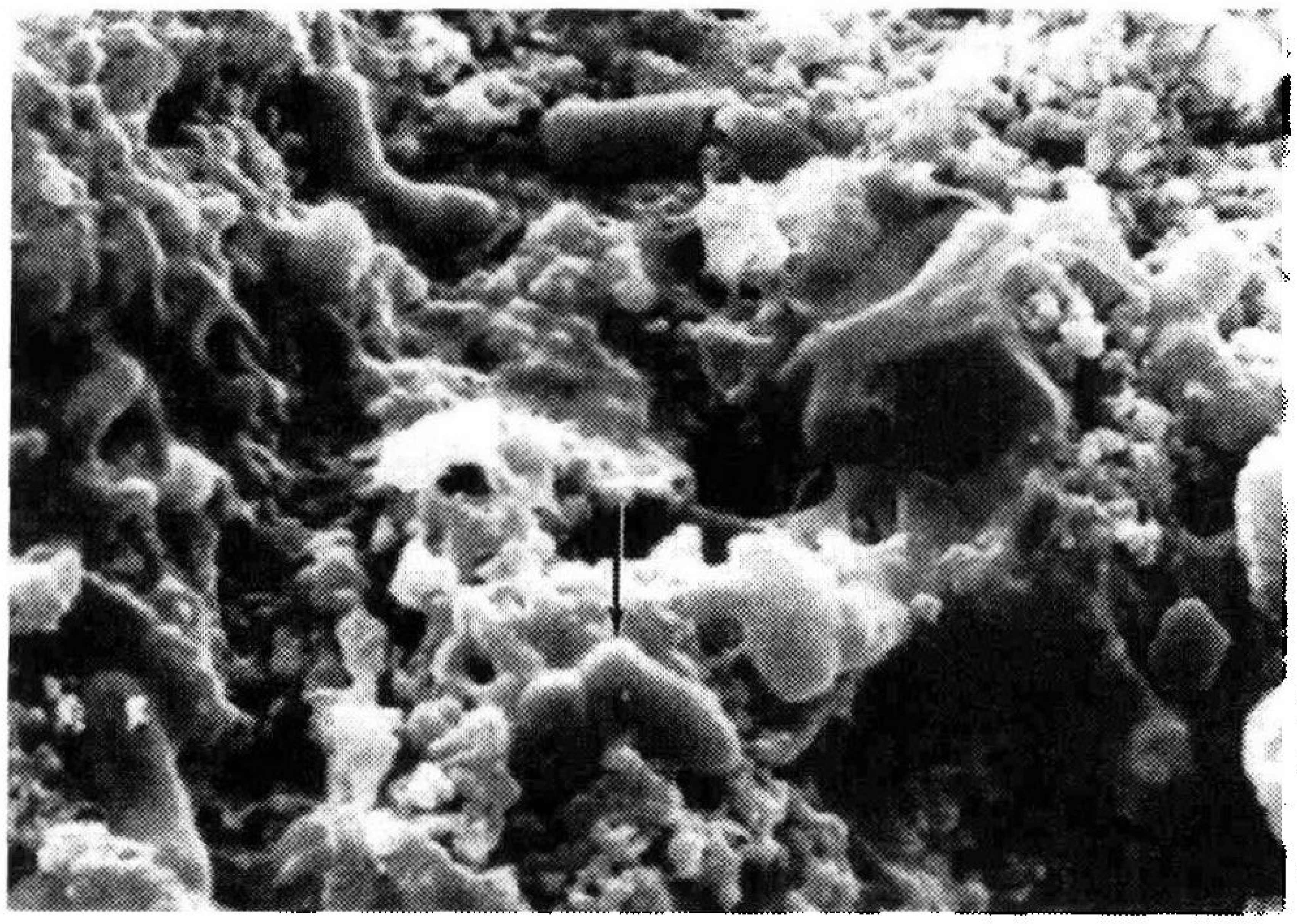


图 11.1 原始的微生物生命。南非 Barberton 绿石带（Greenstone Belt）34.5 亿年历史的岩石中原核生物微化石的扫描电镜显微照片。注意附着在矿物颗粒上的杆状细菌（箭头）。细胞直径大约 0.7μm。

就表明那个时期就存在液态水，也许以海洋或大湖的形式存在。液态水的存在也揭示了这些条件与我们所知的生命是相符的。

早期地球上存在微生物生命的证据

原始岩石中存在微生物生命的证据依赖于带有细胞的化石和这些岩石中同位的"轻"碳丰度（18.8 节中讨论了利用同位素分析碳和硫作为生命过程的证据）。一些原始岩石中含有微小的化石细菌，典型的杆状和球状菌（图 11.1）。

在 35 亿年或更早一些的岩石里，含有丰富微生物的叠层岩形成。叠层石（stromatolite）是由丝状原核生物和截留的沉积物组成的微生物垫化石（图 11.2），我们在 18.7 节中讨论了微生物垫（microbial mat）的一些特征。这些古老的叠层石细菌是什么种类的生物呢？通过将古代叠层石与现代形成于浅海盆地（图 11.2c 和 e）或温泉（图 11.2d 和图 18.18a）的现代叠层石相比较发现，古代叠层石是由丝状光合细菌组成，可能与绿色非硫细菌绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）相关（见 12.35 节）。

图 11.3 显示了一些现代岩石纤细部分的显微照片，岩石中含有与现代丝状菌和绿藻极其相似的类细胞结构（见 14.13 节）。在最古老的叠层石中，这些生物更像是厌氧光合生物（见 12.2 节、12.21 节、12.32 节和 12.35 节）而不是占据现代叠层石的好氧蓝细菌（见 12.25 节和 12.26 节）（图 11.2c，e）。尽管如此，一个不可否认的结论是：原核微生物在地球历史的早期就具有形态多样性。

早期地球的环境：热而缺氧

早期地球的大气层是缺氧的。除了水之外，还存在不同的气体，最丰富的是甲烷、二氧化碳、氮气和氨气。另外，还有痕量的一氧化碳和氢气，相当数量的以 H_2S 和 FeS 混合物形式存在的硫化物。似乎还有相当数量的氰化物（HCN）存在，在早期的

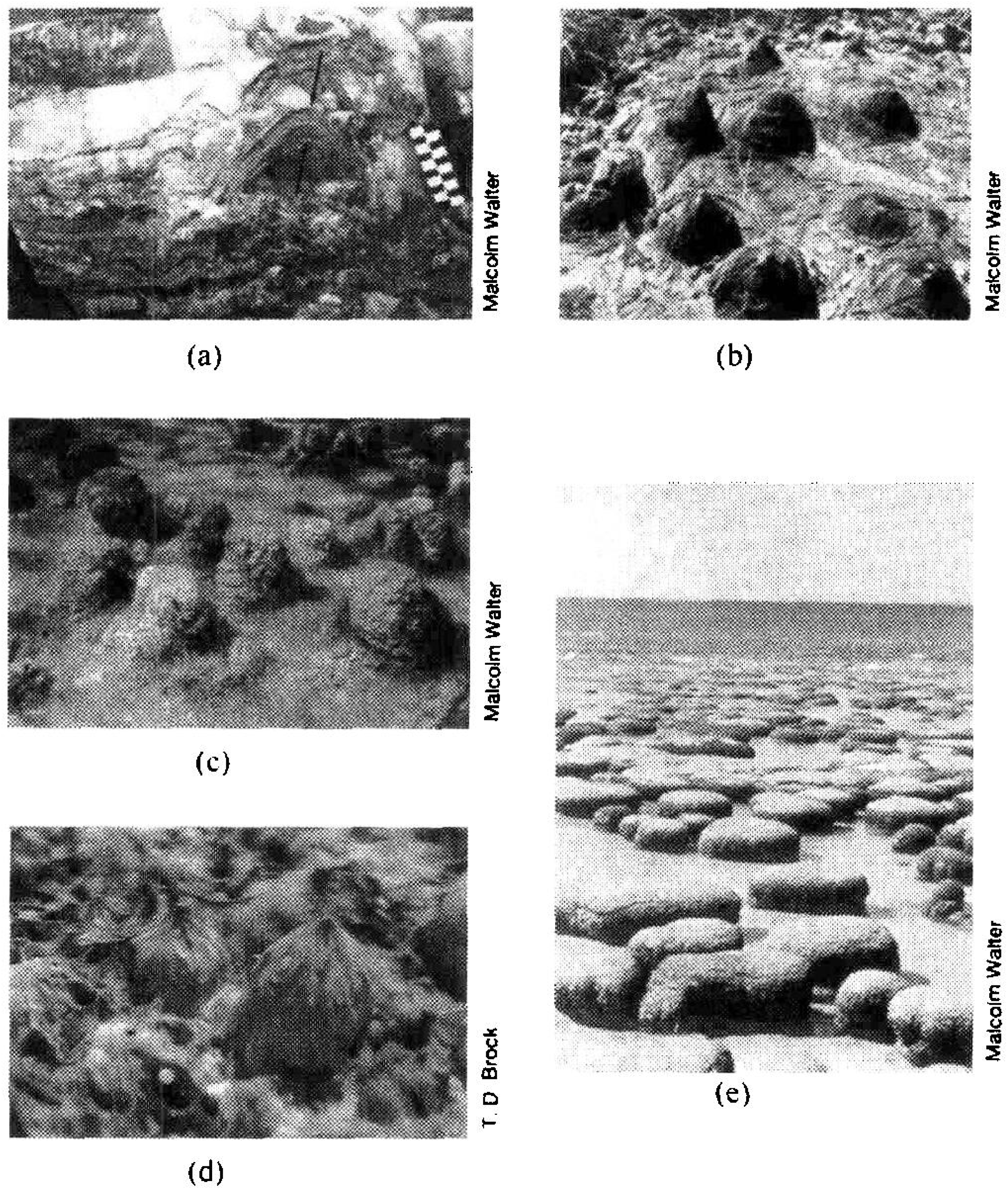


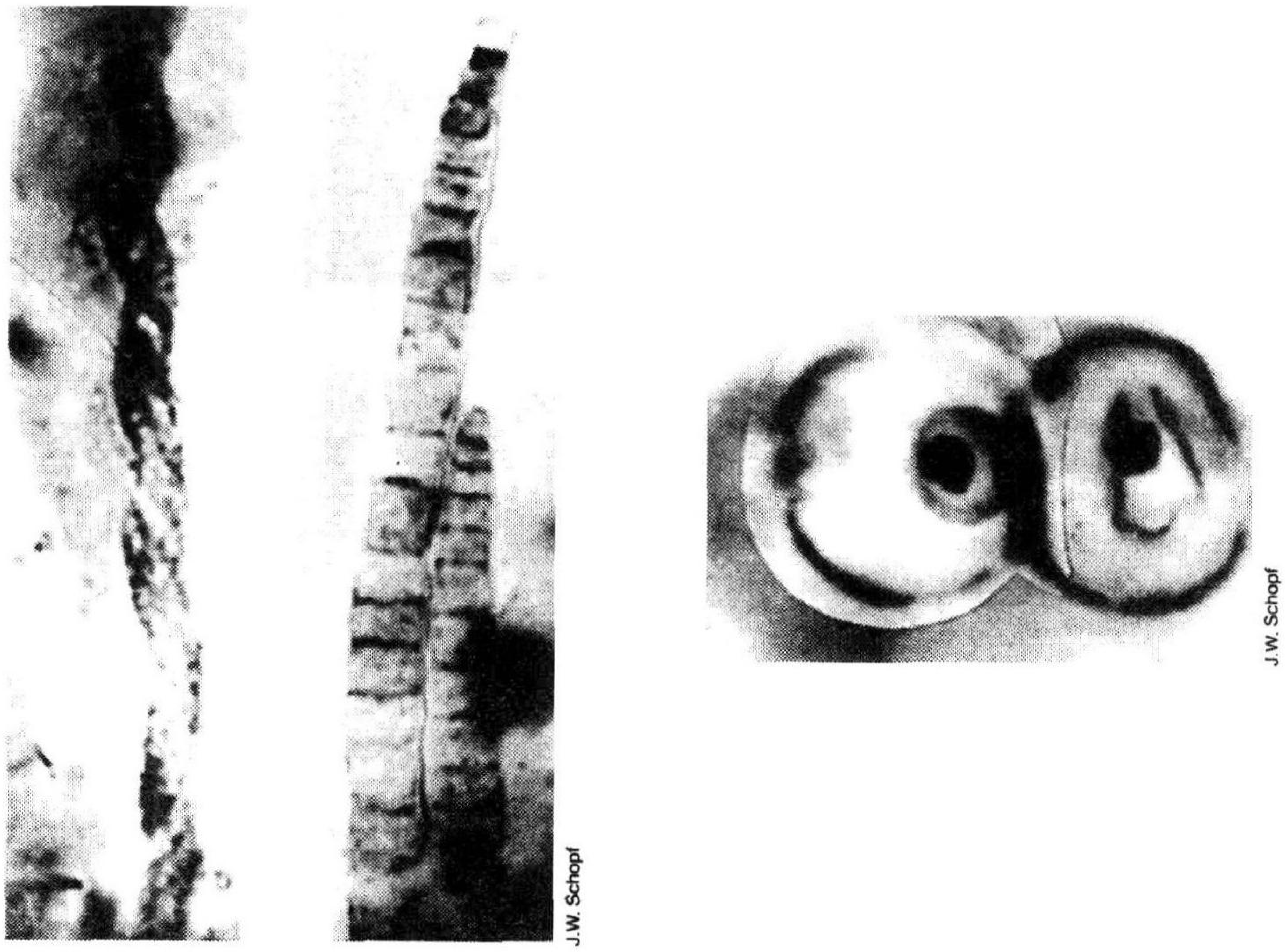
图 11.2　古代和现代叠层石。 (a) 已知最古老的叠层石，发现于西澳大利亚 Warrawoona Group 大约有 35 亿年历史的叠层石中。图中所示是岩石中维持原状的薄层结构垂直部分。箭头所指是薄层。(b) 针状叠层岩，来自澳大利亚北部的 McArthur 盆地具有 16 亿年历史的白云岩。(c) 一个温暖海湾（Shark 海湾，西澳大利亚）中的现代叠层石。(d) 由喜温蓝细菌组成的现代叠层石，形成于黄石国家公园的一个温水池中，每一结构大约 2cm 高。(e) Shark 海湾大型现代叠层岩的另一场景。每一独立结构直径为 0.5～1m。

球上，NH_3 和 CH_4 反应时产生 HCN。

大多数证据表明早期地球比现在热。在地球形成的最初 2 亿年左右的时间里，其表面的温度超过了 100℃。另外，地球经常被陨石轰击。在这种条件下，不可能存在自由水。水仅在地球变凉的时候有所积累。地球冷却的速度是未知的，不过假设在地球依然相当热的某个时候第一次出现了自我复制的实体。因此，早期的生命形式似乎是极其耐热的，在这一点上与超级嗜热原核生物相像（见 6.12 节和第 13 章）。我们将在 11.8 节、11.9 节和 13.13 节中讨论这个假设的证据。

生命的起源

如果含有上述气体的还原性大气处于强烈的能量之下，生物分子就可能自发地合成。原始地球上存在的能源中，最重要的可能是来自太阳的紫外（UV）辐射，因为当时不存在能吸收 UV 的臭氧层。不过，可能也存在放电、放射性活动、陨石撞击产生的热量和火山活动的热能。



(a) (b)

图 11.3 来自比图 11.1 中历史短的岩石的原核和真核生物化石。两张图片：（a）显示 Bitter Springs Formation 中的原核微生物化石，这是大约 10 亿年前澳大利亚中部的一种化石形式。这些化石形式与现代丝状蓝细菌，厌氧光养生物或丝状硫无机化能营养生物十分相似。细胞直径为 5～7μm。（b）来自同一岩石形式的的真核细胞微化石。细胞结构与某些现代绿藻（如小球藻属）非常相似（见 14.13 节）。细胞直径大约 15μm。

如果现在在实验室里用 UV 照射或放电处理与原始地球上相似的气体混合物，则会形成大量生物分子。这些分子包括糖类、氨基酸、嘌呤、嘧啶、不同的核苷酸和脂肪酸。在实验室里模拟生物产生之前的条件，已经聚合了一些生化结构元件，并导致了多肽、多核苷酸及其他重要大分子的形成。因此，我们可以想象，原始地球上积累了大量有机化合物的混合物，这些活动为生命的起源搭建了舞台。当时地球的贫瘠意味着这些有机物会稳定存在，不会像今天一样发生降解。

催化作用和蒙脱石黏土的重要性

在早期地球上想要得到自发合成的大分子，必须存在催化剂。黏土和黄铁矿（FeS_2）的表面具有良好的可能性。这些表面将为大分子的合成及积累的大分子形成有机膜提供一个稳定且相对干燥的环境。经过长时期积累后，这些膜中可能会产生原始的自我复制的结构。

实验显示，蒙脱石黏土（montmorillonite clay）是极好的催化表面。例如，在有脂肪酸和蒙脱石黏土时，能触发细胞的小脂囊泡形成（图 11.4）。混入更多脂肪酸时这些小囊泡显示出自我增大，而且当通过有小孔的滤器时能“分裂”。在这些脂囊泡里，黏

土颗粒也能结合 RNA 并使它们形成小泡（图 11.4）。另外，如果蒙脱石黏土颗粒中加入核糖核苷酸，这些颗粒就能催化 RNA 寡聚核苷酸的自发形成。

尽管黏土催化的囊泡不是现代的细胞，RNA 寡聚核苷酸也不是现代的基因（虽然很多病毒基因组是 RNA。见第 9 章和第 16 章），但是含有 RNA 的囊泡（图 11.4）却显示出许多细胞的特性。如果早期地球形成了这样的自我复制囊泡，鉴于漫长的地质学时期，包含其他大分子及更复杂结构的形式可能被形成。这些结构也许是最初细胞生物的祖先。

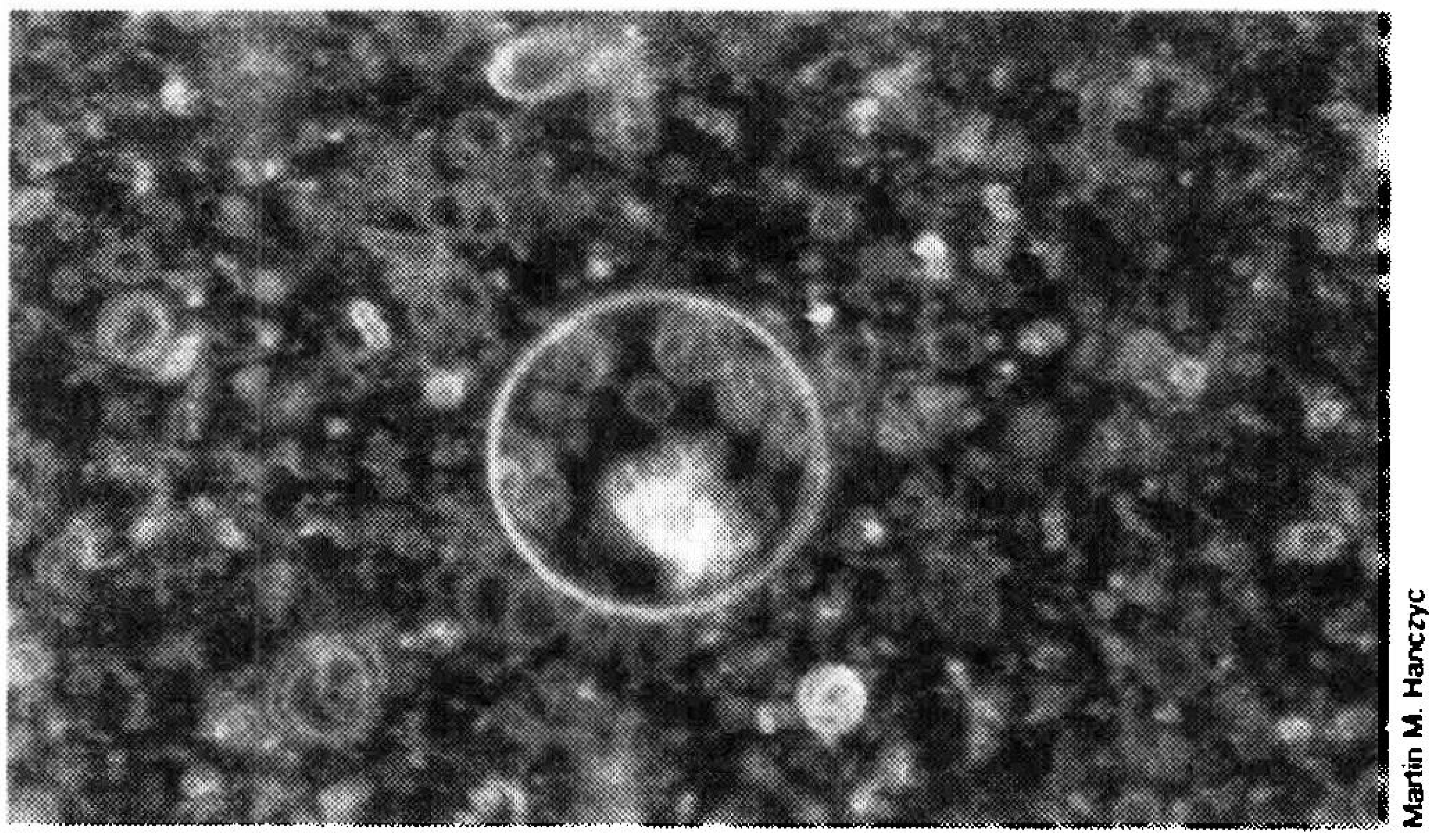


图 11.4 实验中利用脂肪酸、肉豆蔻酸和 RNA 合成的囊泡。囊泡本身被染成绿色，里面的 RNA 复合物被染成红色。囊泡是在蒙脱石黏土颗粒表面催化合成的。

概念检查

地球大约有 46 亿年历史。微生物生命的最早证据出现在距今约 38.6 亿年的岩石中。早期地球是无氧的，而且远比现在热。最早的生化复合物是非生命合成的，搭建了生命起源的舞台。

◆ 早期地球大气与现今地球大气相比有何区别？

◆ 早期生化物质是如何形成的？

◆ 在生命起源中蒙脱石黏土起什么作用？

11.2 原始生命：RNA 世界和分子编码

最早能自我复制的实体是什么样的呢？基于我们现在对生命的了解，可以推测早期生命形式比现代细胞简单，就算是最简单的自我复制实体也都显示出至少两个特征：①获得能量的手段；②一些遗传形式。但是这些特征需要细胞结构吗？

人们试图从现在往后推，推测早期生物与现代细胞相像但仅含有几个基因，具有优先的转录和翻译能力。然而，这样的结构已经是相对复杂的了，可能远比早期自我复制的实体复杂的多。那么，后者应该是什么样的呢？随后发现，某些类型的核糖体核苷酸（RNA）是催化剂（见 14.8 节）。现在很多科学家认为，最早的生命形式可能不完全是

细胞而是裸露的 RNA。如果真是这样，可能就是“RNA 生命”（RNA life）时代，当时的 RNA 具有执行催化和遗传编码两种功能。

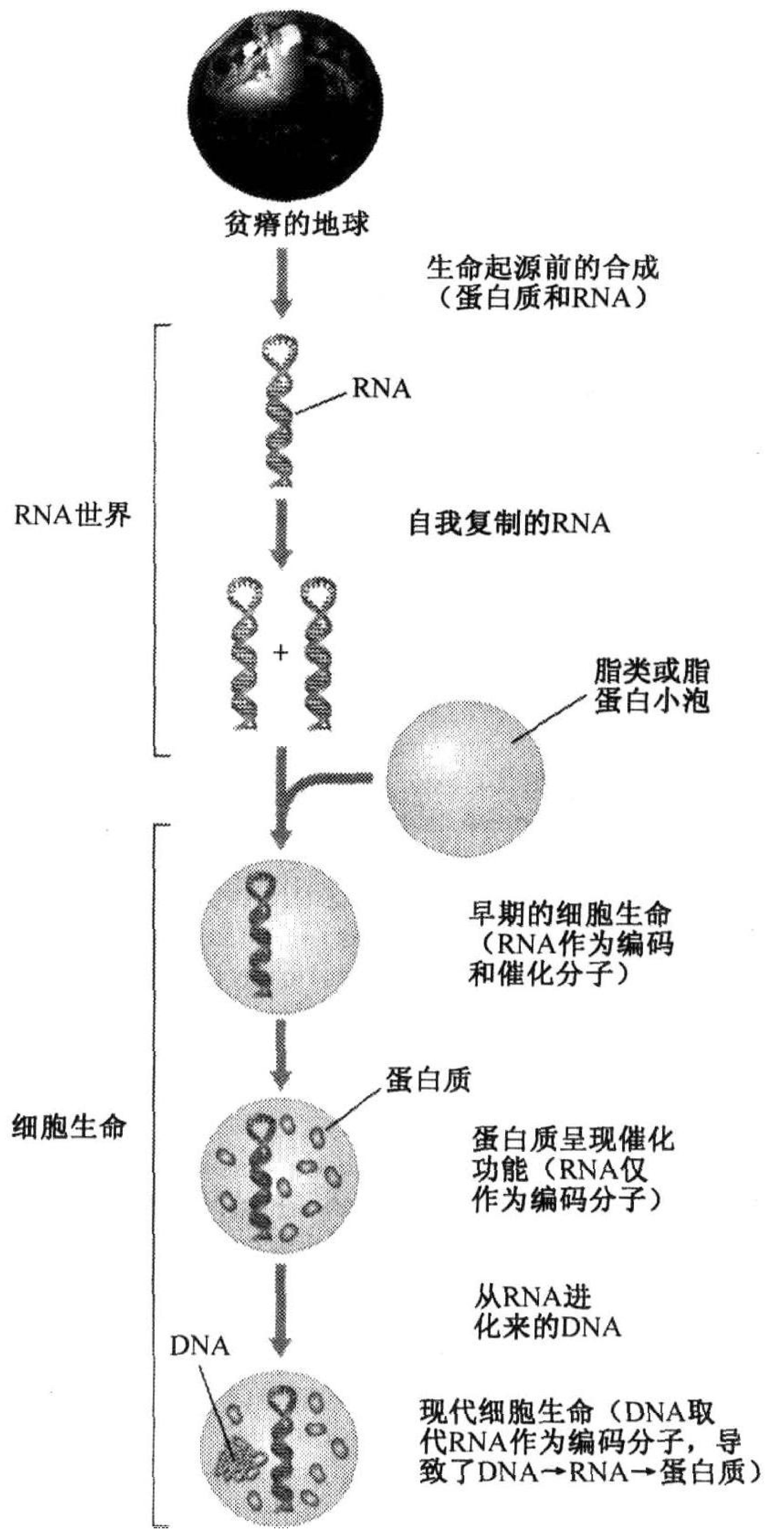


图 11.5 从 RNA 生命形式到细胞生命形式进化的可能过程。 自我复制的 RNA 通过稳定整合到脂蛋白囊泡中而能够成为细胞实体。后来，蛋白质取代了 RNA 的催化功能，DNA 替代了 RNA 的编码功能。

RNA 生命

在 RNA 世界（RNA world）里——如果它曾经存在过，各种自我复制的 RNA 可能执行着对于它们自我复制必不可少的催化反应（图 11.5）。这种观点并不牵强，因为甚至现在还存在着那样的 RNA。各种催化性 RNA [核酶（ribozyme），见 14.8 节] 能够催化几种不同的反应，包括自我复制。而且，某些核酶能利用糖和含氮碱基合成核苷酸，把氨基酸聚合成多肽。

当被包裹进脂蛋白囊泡中时，自我复制的 RNA 生命就进化为最早的细胞生命形式，可能和蒙脱石黏土囊泡（图 11.4）相似。这一步在早期地球上可能发生过无数次，但是最后，合适的成分和环境一起出现，就出现了能自我复制的原始的封闭结构（图 11.4 和图 11.5）。尽管仍然缺少 DNA 和蛋白质，这种原始细胞生命形式在其他方面也与现代细胞相像。

当这些结构复制的时候，自然选择可能推动了它们的进化进程。这可能包括选择更有效的催化剂和更稳定的遗传编码方法。我们都知道，蛋白质比 RNA 具有更高的催化专一性。因此，当原始生物变得更复杂而且需要更多催化反应时，蛋白质可能取代 RNA 成为细胞主要的生物催化剂。但这并不是一夜之间完成的。蛋白质好像是逐渐出现在细胞中的，可能最初与 RNA 结合在一起（现代细胞中已清楚地知道，可作为核蛋白复合物）。然而，由于进化选择越来越精确的催化剂，最终 RNA 几乎被作为细胞内酶的蛋白质完全取代（图 11.5）。至此，现代细胞清晰地浮现在地平线。

现代细胞：DNA ⟶ RNA ⟶ 蛋白质

为什么会出现DNA细胞？这可能有几个原因。DNA成为细胞的基因组可能是由于细胞需要把遗传信息保存在细胞的某一地方，并保持一种稳定的形式，从这里基因被表达而产生蛋白质。随着进一步的进化，出现了选择性表达，后者影响细胞的能量节约。现在我们在原核生物中看到，在这一范围持续的进化变异导致了广泛而高级精确的代谢控制。

RNA作为遗传物质的不稳定性可能也导致DNA系统的出现。为了细胞的进化，系统必须有高度的遗传稳定性，否则有利的遗传特点不会忠实地代代相传。原始细胞中这种遗传稳定性的需要可能是早期细胞中DNA由RNA转变而来并作为主要遗传分子的进化动力。可能是由于与它们底物特性有关的原因，RNA聚合酶天生没有DNA聚合酶准确。因此，为了确保遗传信息忠实地代代相传，进化最终选择了DNA基因组。不过，在蛋白质合成过程中仍保留有RNA，此时它们作用为催化剂（甚至在现代细胞中）（见7.16节）。

在微生物进化早期的某个时候，三部分系统（DNA、RNA和蛋白质）变成细胞中生物信息过程的固定的最佳组分。显然这个系统是进化的成功，所有现代细胞均包括这三种类型的大分子。

概念检查

最早的生命形式可能是自我复制的RNA。它们既提供信息又是催化剂。最后，DNA变成了遗传物质的储存场所，并且三部分系统（DNA、RNA和蛋白质）在细胞中变得普遍起来。

◆ 什么证据能支持RNA存在时期概念？为什么RNA生命形式不可能存活到现在？

11.3 原始生命：能量和碳代谢

生命是一个高度有序的过程。把各种各样的分子聚集起来使之成为一个复杂的生物机器——细胞，这一过程需要能量。原始的自我复制实体是怎样满足能量需求的呢？对于起催化作用的RNA，需要的能量可能来自它们催化的反应放出的热量。但是对于细胞来说，能量转换却是一个重要问题。

直到进化出现了蓝细菌，分子氧在地球上才大量聚积（图11.7）。因此，仅仅能在缺氧环境下产生能量的机制可以被原始细胞利用，以维持它们的能量需求。然而，正如我们将在第17章看到的，厌氧环境对微生物的代谢多样性有一些限制。因此，各种各样的有机化能营养、无机化能营养的能量产生机制和一些光能合成就在缺氧条件下发生了。所有这些机制都相当复杂，不过，简单一些的机制可能会流行起来。

含有铁离子（已知早期地球上有丰富的铁离子）的反应经常被认为是原始生物产生能量的反应。例如，反应：

$$FeS + H_2S \longrightarrow FeS_2 + H_2 \quad \Delta G^{0'} = -42kJ/反应$$

是一个释放能量的过程。这一反应产生 H_2，原始细胞能利用这个强有力的电子供体来产生质子动势。后者能驱动原始的ATP酶产生ATP（图11.6）。早期地球上另一个 H_2 的来源可能也来自于铁离子。例如，在紫外辐射作为能源时，Fe^{2+} 能把质子还原为氢（图11.6）。一般认为，早期海洋含有铁离子，而且其表面水遭受强烈的UV辐射。

以 H_2 作为电子供体，需要有电子受体才能形成一个氧化还原对（见5.6节），这个受体可能是硫（S^0）。如图11.6所示，把 H_2 氧化成 H_2S 需要几个酶。而且，由于早期地球含有丰富的氢气和硫化物，所以细胞的能量供应几乎是没有限制的。有趣的是，许多超级嗜热的古生菌（我们会在后面看到，它与超级嗜热菌是地球早期生物中关系最近的）能以 S^0 为电子受体氧化氢气。

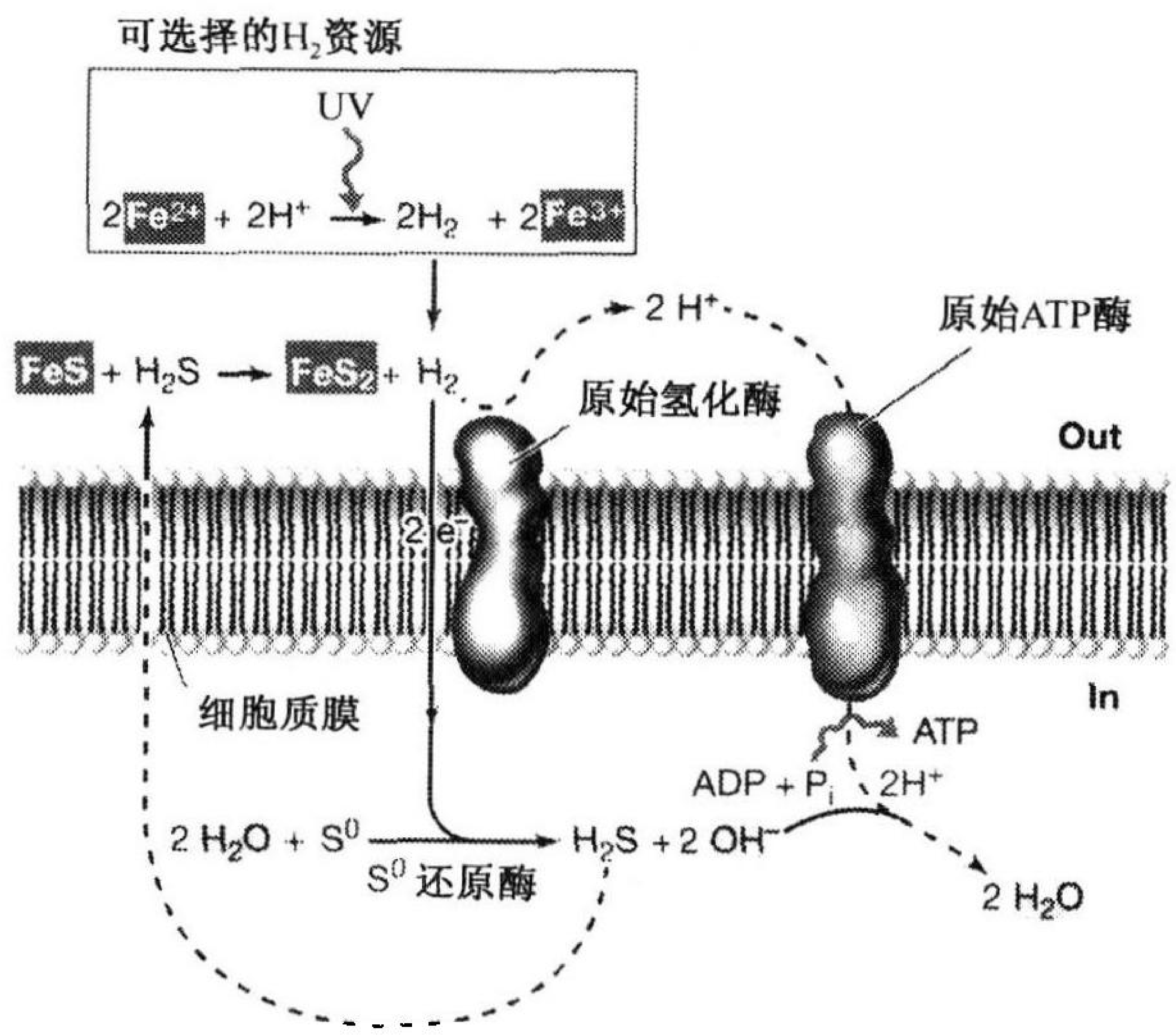


图11.6 原始细胞可能的能量产生系统。 黄铁矿的形成导致 H_2 的产生和 S^0 的还原，驱动原始ATP酶。注意，H_2S 是如何发挥催化作用的，底物是FeS和 S^0。还要注意需要几种不同的蛋白质。$FeS + H_2S \longrightarrow FeS_2 + H_2$ 该反应 $\Delta G^{0'} = -42kJ$。H_2 的另一个来源如图所示，UV催化的 Fe^{2+} 还原 H^+ 产生 H_2。

原始生物可能从不同的资源中获得碳，包括从二氧化碳（早期地球含量丰富的气体）合成的有机碳。利用二氧化碳必须在进化出自养方式后，自养方式才能在细胞内将二氧化碳转化成各种有机成分（见17.6节和17.7节）。尽管最初认为这是不可能的，但是认为自养是早期生理过程的假说已得到了认可，这一认可是基于原核生物如产液菌属（*Aquifex*）的发现。这种细菌的成员是超级嗜热的，含有一个很小的基因组，其分支在生命进化树根部附近（图11.16）。所有这些成员都与“原始”状态相关。因此，很有可能早期原核生物以二氧化碳作为其生长的主要或唯一碳源。

分子氧：铁条带形式

地球进化历史的一个里程碑是蓝细菌光合产生氧气（图11.7）。大约在28亿年前，蓝细菌最初出现在地球上，但是它们产生的氧气并没有在大气层中积累，因为所有还原

性物质（如 FeS）在海洋中依然存在，这些物质自发地和氧气结合产生水。在黄铁矿的氧化作用下，产生的 Fe^{3+} 成为地质学记录中的一个明显标志。蓝细菌是从厌氧光合有机体进化来的，通过进化产生能利用水作为电子供体的还原二氧化碳的光合系统，这个系统释放氧气作为其副产品。我们在第 17 章讨论光合作用的生物化学。

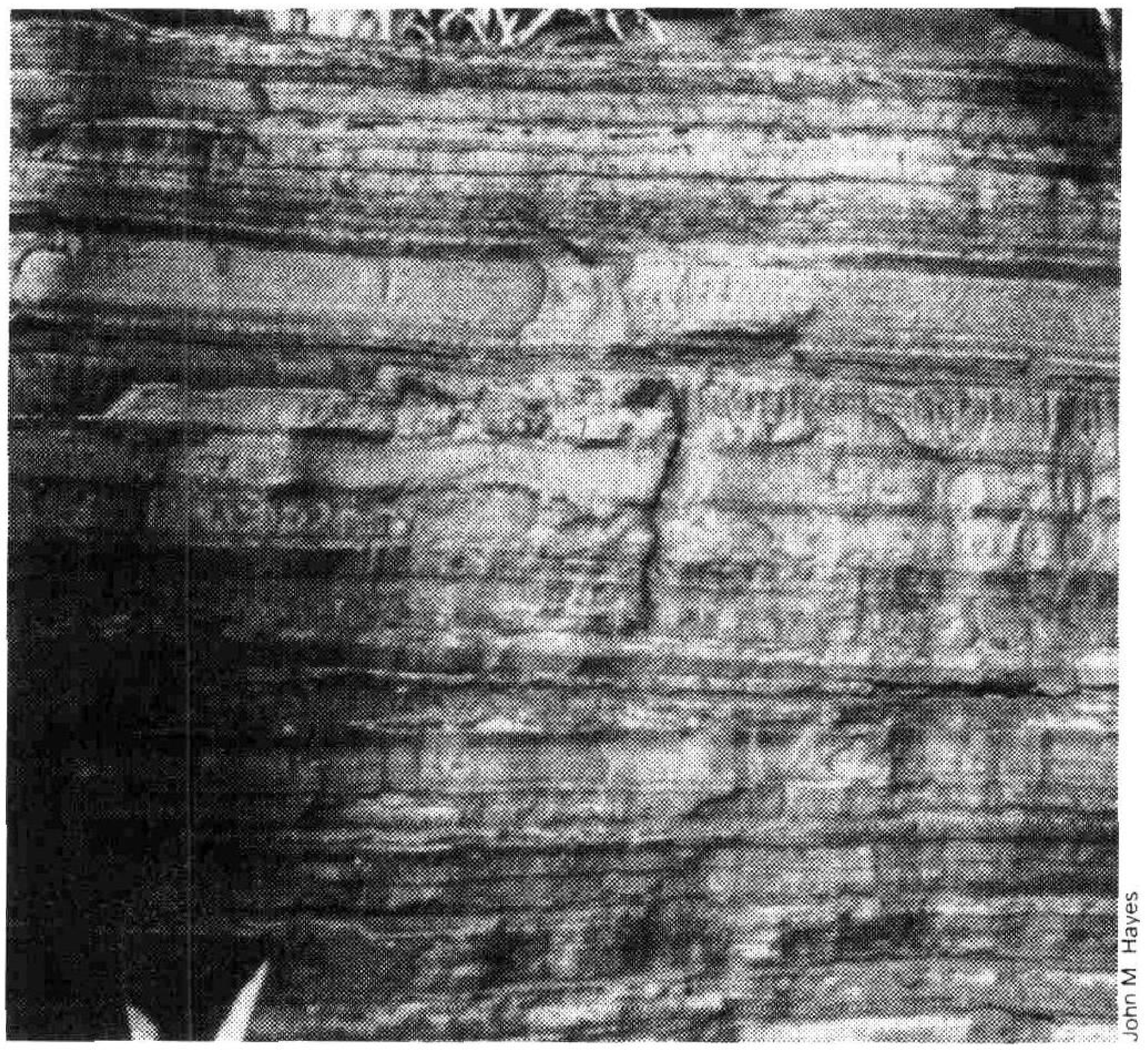


图 11.7 铁条带形式。 一个暴露的约 10m 高的悬崖含有铁氧化物层，中间点缀着矽酸铁层和其他矽化物。Brackman 铁形成层、Hammersley 盆地、西澳大利亚。铁氧化物包括由蓝细菌光合作用释放的氧气氧化二价铁离子（Fe^{2+}）生成的三价铁离子（Fe^{3+}）。

大部分铁在起源于前寒武纪（大于 5 亿年前，图 11.8 ）的岩石中发现，以铁条带形（BIF）存在（图 11.7）。这些是富含铁和富含硅酸盐层交替出现的薄层沉积岩。BIF 的历史从 19 亿年到 27 亿年。人们认为生氧光合作用（蓝细菌）的进化出现在 27.5 亿～30 亿年以前。蓝细菌产生氧气的代谢把以 Fe^{2+}（如 FeS）存在的铁氧化成 Fe^{3+}。三价铁离子形成各种铁氧化物，这些铁氧化物积累形成 BIF（图 11.7）。一旦 Fe^{2+} 被消耗，就为大气中积累氧气创造了平台，这在原核和真核世界里都是一个重要的促进进化的过程（图 11.8）。

大气层中的氧气的产生：新的代谢和臭氧层

生氧光合作用的出现对地球产生了深刻影响，因为随着氧气的积累，大气层从无氧变成有氧（图 11.8）。当时氧气作为可利用的电子受体，可能进化出好氧生物，这些生物能从有机化合物的氧化中比厌氧生物获得更多的能量（第 17 章），允许发展出更大的种群从而增加了进化出新型生物和代谢策略的机会。地球大气变成有氧时代的化石记录为当时的进化大暴发提供了充分的证据。它促进了具有细胞器的真核生物的出现及多细胞生物进化的迅速多样化。随着不断的进化，最终出现了动物和植物（见 11.9 节和图 11.16）。

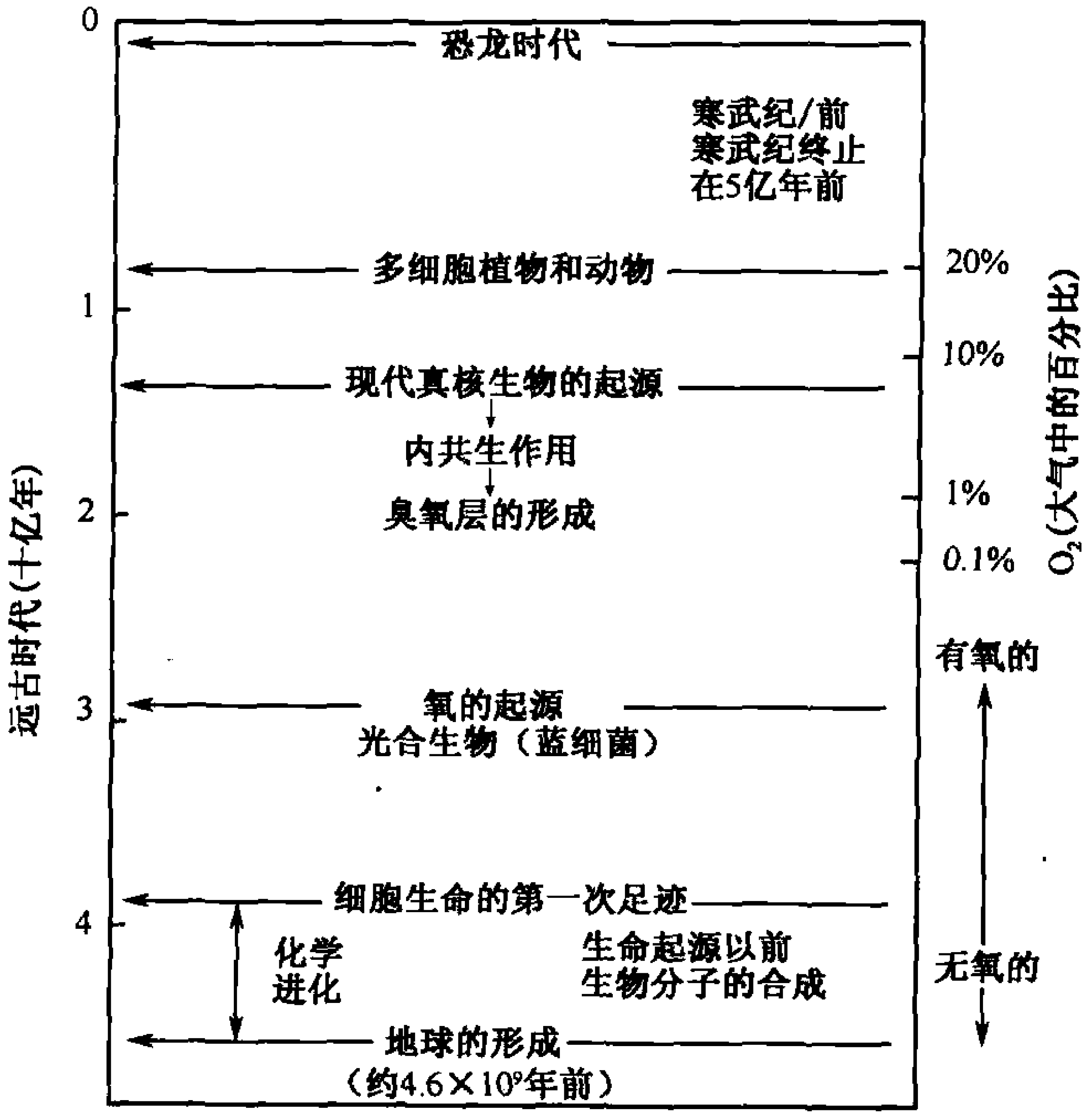


图 11.8 生物进化和地球化学变化的主要标志。 1GY 是一个 10 亿年，注意源于蓝细菌代谢的大气的产氧过程是渐进的，大约需要 20 亿年的时间。尽管最高氧气水平（20%）对于动物和其他高等生物是必需的，但是对于原核生物却不是这样，因为它们很多在好氧或微好氧条件下也能生存（见 6.15 节和表 6.4）。因此，在弱氧气水平呼吸的原核生物在地球大气达到现在氧气水平之前的大约 10 亿年时间里支配着地球。

氧出现的另一个重要影响就是臭氧的形成，臭氧能提供一个屏障来阻止太阳辐射的强烈紫外线到达地球。当氧气处于短波 UV 辐射时，它就会变成臭氧，臭氧能强烈吸收高达 300nm 的短波。在臭氧层形成之前，进化只能在免受太阳直接辐射的地方持续进行，如岩石下或海洋中，因为强烈的 UV 辐射能导致致命的 DNA 损伤。然而，随着光合作用产物氧气的产生及随后的臭氧层的出现，微生物就能够遍布整个地球表面，从而允许生物更多样性的进化。图 11.8 总结了生物进化的主要步骤及地球从一个具有高度还原性到具有高度氧化性星球的变化过程。

概念检查

早期的代谢是厌氧的，并与无机化能营养相似，从而能够利用丰富的 FeS 和 H_2S 资源。碳代谢可能包括自养作用。产氧的光合作用导致了铁条带的形成，导致了氧化环境及生物进化的大爆炸。

- ◆ 早期细胞如何从 FeS+H_2S 中获得能量？
- ◆ 为什么认为蓝细菌的出现是进化中的关键步骤？
- ◆ 铁在 BIF 中以何种形式存在？

◆ 臭氧在生物进化中扮演什么角色？蓝细菌产生臭氧？

11.4 真核生物和细胞器：内共生

第 2 章展示了真核微生物多样性的梗概（见 2.6 节）。第 14 章将更加详细地研究真核微生物。这里，我们讨论现代真核细胞是如何进化出它具有特征的内部结构的：由膜包裹的核和细胞器（organelle）。

核的起源

原始真核细胞可能由结构简单的细胞组成。像现代原核细胞，它们缺少线粒体、叶绿体和膜包裹的核。最初的核是怎样出现的呢？

随着 DNA 分割成不同单位（染色体），进化出了核和有丝分裂器，真核细胞家族才变得庞大起来。染色体的出现可能是为了确保 DNA 有序的复制和分离。这是因为，当原始基因组出现时，DNA 将不再可能作为独立的分子负责进行复制（如在原核生物中）。核的出现使得基因组易于操作，这些基因组是更复杂的、真核细胞需要的更大的基因组，也使通过有性生殖导致的基因重组变得成为可能（见 2.2 节和 14.7 节）。

当地球依然无氧时，没有明显的原因表明为什么原核和真核生物除了核还需要细胞器，因此，一些细胞器可能进化得比较晚。不过，它们的出现是一个非常有趣的过程，并且我们现在能看到这一过程。

内共生

现代真核细胞（含有细胞器）并不是随着细胞功能分化成封闭的结构——细胞器而逐渐出现的。细胞器反而是起源于有机化能营养和光养微生物（图 11.9）稳定的内共生细菌。这个过程就叫内共生（endosymbiosis）（endo 的意思是内部），可能开始是一个好氧细菌在原始真核生物的细胞质中定居，并为细胞提供能量以换取稳定的保护性环境及现成的养分供给（图 11.9）。这个共生体就是现代线粒体的前身。产氧光养原核生物的内共生使得其在原始真核生物内转变为光合成分，这样的细胞能进行光合作用而不用有机化合物来获取能量。这个光养内共生体是现代叶绿体的前身（图 11.9）。

一些真核细胞或者是从没吸收过内共生体，或者是某一时候吸收了它们后来又分泌出去，可能因为它们生存的小环境永远是厌氧的。现在知道自然界存在着这些缺少细胞器的真核生物（见 14.2 节和 14.9 节）。大部分内共生体可能增加了对宿主细胞的适应性，因此，现在含有细胞器的真核细胞占优势。微化石记录（图 11.3）表明，内共生事件的出现始于约 20 亿年以后的某一时代（图 11.10）。

内共生作用不可能一蹴而就，而是一个复杂的过程，甚至可能是原核细胞和早期真核细胞共同拥有的过程。不稳定的或有害的共生体没有被保持，而有益的却保持下来了。选择有助于筛选有益的共生体；这包括对共生体结构的修饰（如丢失一个细胞壁），基因组修饰及从共生体到宿主细胞的基因转移（见 14.9 节和 15.7 节）。从这些共生体中诞生了现代真核细胞。

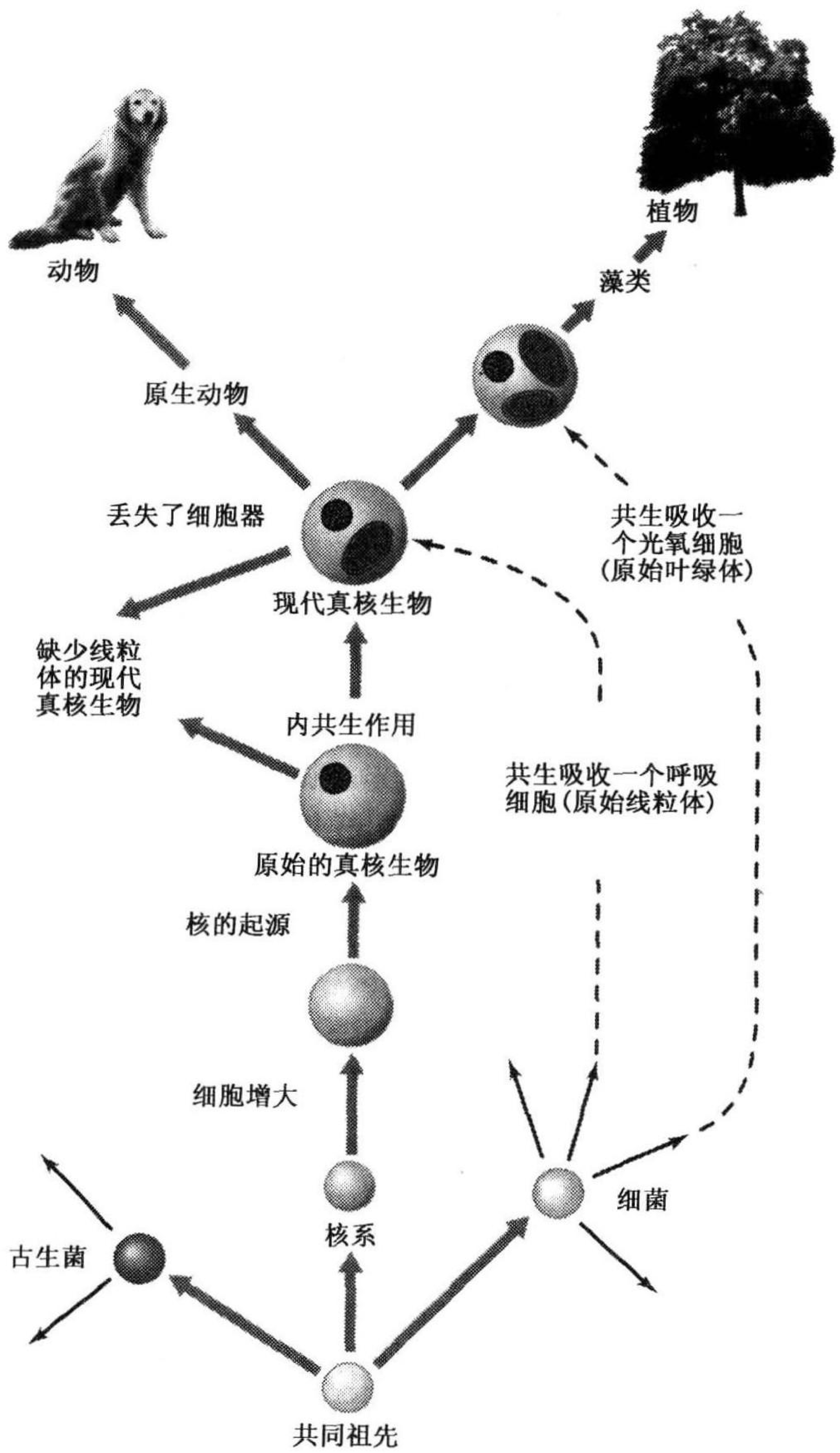


图 11.9 由内共生引发的现代真核生物的起源。注意细胞器是如何从细菌而不是从古生菌起源的。一些原始真核生物或是从没有经历过内共生事件或是永久性地丢失了它们的共生体，相反它们却获得了真核细胞的基本特征。此图与图 11.16 的比较显示出了细胞器起源的细菌之间的谱系。

内共生的证据

大量证据支持内共生假说。例如，线粒体和叶绿体都含有原核类型的核糖体，还显示出某些细菌中特征性 16S rRNA 序列（见 11.6 节）。而且，细胞器核糖体能被影响自由生活细菌核糖体功能的抗生素所抑制（见 14.5 节）。线粒体和叶绿体也含有少量原核生物中典型的共价闭合环状 DNA（见 2.2 节）。的确，许多十分明显的迹象表明，现代细胞中的细胞器存在着来自原核生物的背景（见 14.4 节）。

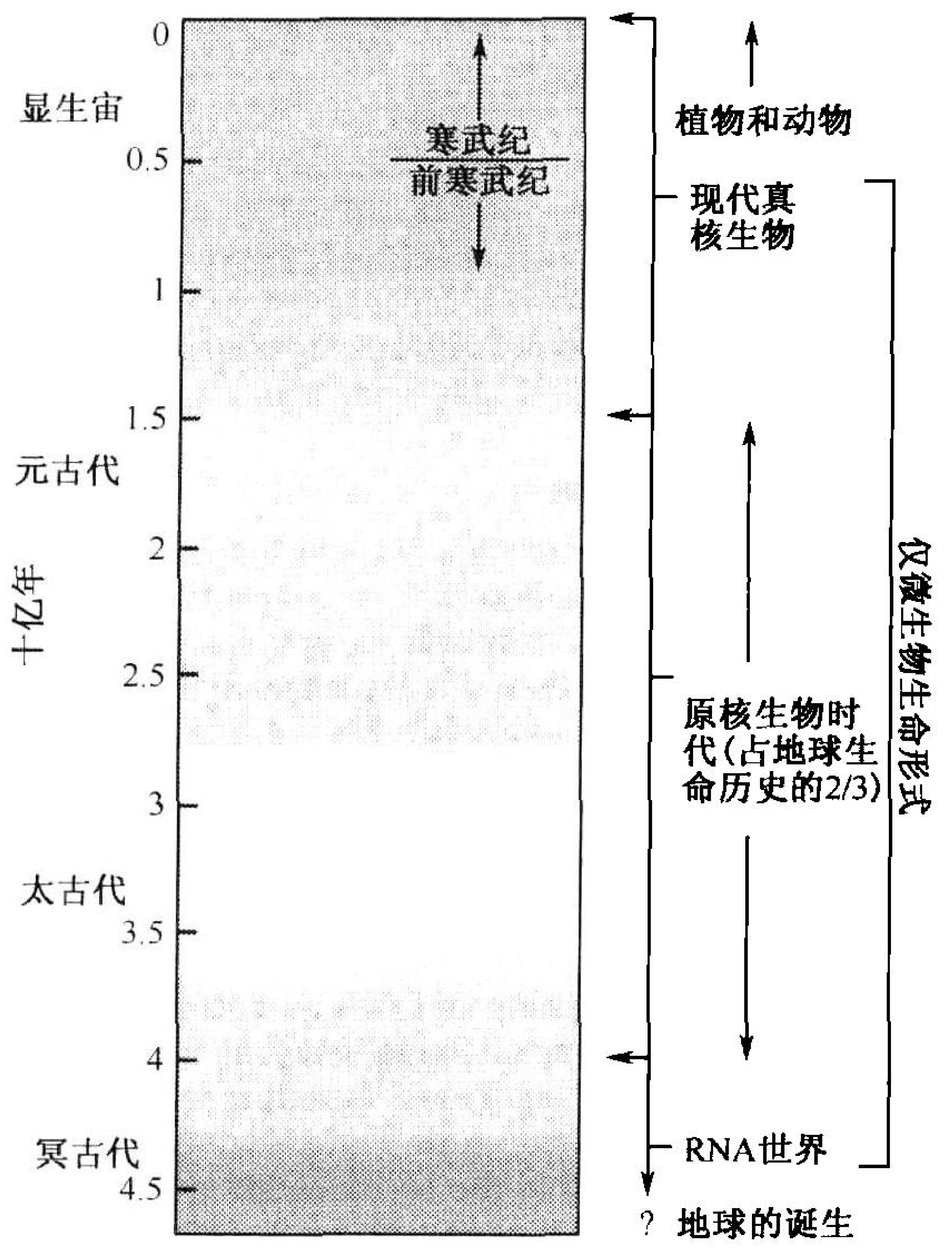


图 11.10　地球上的自我复制实体时代。左边的刻度把生命形式和重要地质时期对应起来。

直到现在仍进行着内共生过程。例如，许多原生动物，尤其是厌氧的原生动物中，含有共生的原核生物（图 19.25)。尽管这些共生体具有完整的细胞功能而不是我们在叶绿体和线粒体中发现的高度修饰的细胞，但是它们表明，为了双方的优势，真核细胞能够而且仍然在吸收原核细胞。

内共生作用使真核细胞家族产生进化。呼吸和光合能量的存在把这些新的重要特征赋予了真核细胞，从而为生化多样性的出现创造了条件。从大约 15 亿年前到现在这一时期见证了单细胞真核微生物和后生动物的出现与多样化，结构复杂的高等植物和动物的涌现使这一多样化达到高峰（图 11.8，图 11.9 和图 11.16)。

生物进化和地质年代的估算

从最早的后生动物起源到现代，占据了地球生命总时间的 1/6。也就是说地球生命历史的 5/6 仅限于微生物生命，而这段时期的大部分又仅限于原核生物。在这一时期之前，是无细胞复制的生命形式（RNA 世界)，如果这样的结构确实存在过的话。在这之前，从最准确的意义上来说地球是贫瘠的。这些生命进化史上的时代在图 11.10 中是用地质年代估算来总结的。

后生动物留下了可观而又高度多样性的记录，因此，从后生动物到现代时期对生物进化的了解相当详尽。然而，对于微生物进化史的了解却非常不完整，尤其是原核生物。事实上，直到 1/4 多世纪之前，原核生物的进化史仍是一个谜。鉴别进化关系的分

子生物学方法的出现开创了进化科学的新途径，尤其在微生物进化领域。现在我们研究这段历史，能看到这些方法怎样使我们把所有细胞放到一个生命系统发育树上。

概念检查

真核细胞的核及有丝分裂器的出现或许是为了保证大基因组生物 DNA 的有序分配。真核生物典型的产能细胞器线粒体、叶绿体起源于真核细胞内共生的细菌，这一过程称为内共生作用。假设存在 RNA 世界，那么自我复制实体在地球上普遍存在了超过 40 亿年。

◆ 在地质时期中什么时候第一次出现真核生物？什么时候出现后生动物呢？

◆ 支持细胞器曾经是自由生活细菌的证据是什么？

Ⅱ 确定进化关系的方法

在接下来的几节我们将讨论微生物的系统发生（phylogeny）——进化关系。重点是核糖体 RNA 的相对序列。通过这些研究，诞生了第一张微生物系统发育图。另外，所用的技术为微生物生态学和临床诊断技术提供了新的研究工具。

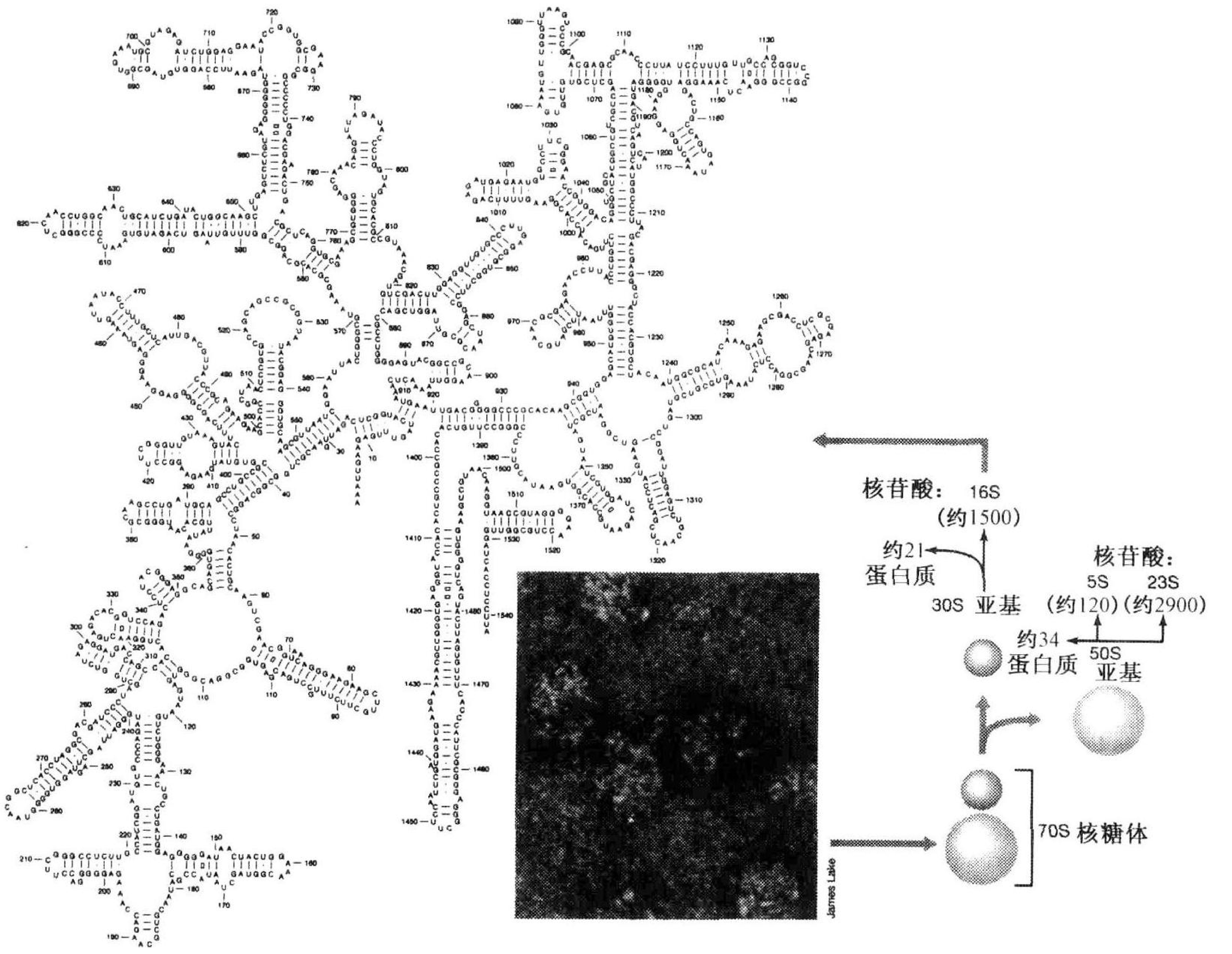
11.5 进化计时器

某些基因和蛋白质是衡量进化程度的进化计时器（evolutionary chronometer）。换句话说，核苷酸序列或者功能相似（同源）大分子氨基酸序列的差异表示了它们的进化距离。然而，为了用分子序列来衡量进化距离，选择正确的分子来进行序列研究是很重要的。

分子计时器的标准

一个好的分子计时器必须有一些标准。分子计时器（molecular chronometer）必须普遍分布在所研究的群体中，这有利于对所有生物进行比较；该分子在每种生物中必须具有功能同源性，具有功能差异的分子不能显示出其序列相似性；该分子应具有序列保守区以便对分析的序列进行排位，这是很重要的；最后，该分子序列应能以所研究生物作为一个整体来反映其进化变化。事实上，测定的系统发育距离越大，序列变化率就必定越慢，这是因为长时期太多的变化搅乱了进化信号。

许多基因和蛋白质被定为进化计时器。不过，编码核糖体 RNA 的基因，是翻译系统的中心成分（见 7.14～7.16 节）；ATP 酶是合成或水解 ATP 的酶复合物（见 5.12 节）；RecA 是促进基因重组的酶（见 10.6 节）和一些翻译蛋白质已经提供了关于微生物的最具洞察力的系统发育信息。所有这些分子对相当原始的细胞都是至关重要的，因此它们的基因序列变化能使我们更深入地了解过去的进化。这里我们讨论的焦点是这些计时器中应用最广泛的核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）（图 11.11）。



(c) (a) (b)

图 11.11 核糖体 RNA。(a) 大肠杆菌 70S 核糖体的电镜照片。(b) 核糖体的几个组成部分；5S、16S 和 23S 是指核糖体小亚基上不同形式的 RNA。(c) 16S rRNA 的一级结构和二级结构。这是大肠杆菌的 16S rRNA；古生菌 16S rRNA 的二级结构（折叠）具有普遍的相似性，而一级结构（序列）则差别很大。16S rRNA 在真核生物中的对应物是存在于细胞质核糖体中的 18S rRNA。

作为进化计时器的核糖体 RNA

rRNA 的一些特征使其成为极好的进化计时器。rRNA 相对较大，功能稳定，分布广泛，并且包含着一些所有细胞保守性的核苷酸序列。rRNA 分子有三种类型，在原核生物中分别是 5S、16S 和 23S（S 指 Swidberg，用于衡量离心场中颗粒沉降速度的重量单位)。测序 16S rRNA，或是真核生物中与其功能相似但稍大一点的 18S rRNA。因为 16S rRNA 和 18S rRNA 是核糖体小亚基（30S 或 40S）的一部分（图 11.11b)，小亚基（small subunit ，SSU）的序列测定与 16S 或 18S 的序列测定是同义的。

rRNA 序列有一个巨大的数据库。例如，核糖体数据库工程（ribosomal database project，RDP）集合了这些数据，现在已经超过 100 000。可以网上进入 RDP（http：//rdp. cme. msu. edu/html/)，而且除了序列，它还有系统发育指导、参考引文、新发序列预告及一些专栏。

伊利诺大学的 Carl Woese 于 20 世纪 70 年代早期最先把 SSU rRNA 作为系统发育工具，现在这种方法已经广泛应用于生物学领域。Woese 因此获得了瑞典皇家学会颁

发的克拉夫奖，克拉夫奖是生物科学成就的最高荣誉。

概念检查

通过 rRNA 的序列比对可以确定生物间的进化关系。对于所有主要的原核和真核群体，现在已经用 rRNA 序列构建出了系统发育树。

◆ 为什么说 rRNA 是一个好的进化计时器?

◆ RDP 是什么?

◆ Carl Woese 是谁?

11.6 作为分子进化工具的 rRNA 序列

由于分子生物学和计算机分析的结合，现在获得 rRNA 序列及创建系统发育树的方法已经相当常规化。新产生的序列可以与 RDP 里及其他遗传数据库如 GenBank（美国）、DDBS（日本）或者 EMBL（德国）里的序列进行比对。然后，利用一个绘制系统发育树的方法，就产生了一个很好地反映序列中固有的进化信息的系统发育树。

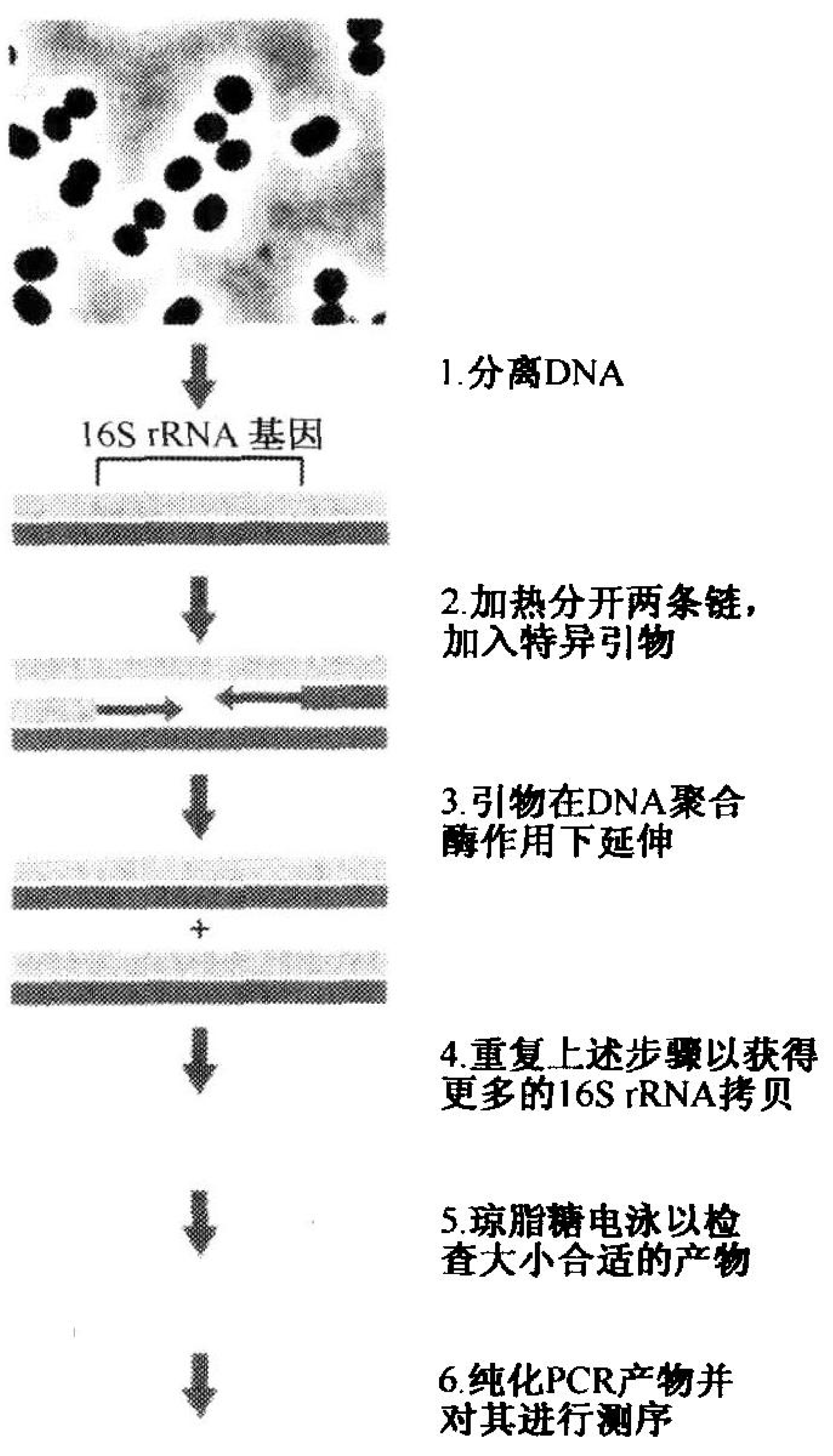


图 11.12 用聚合酶链反应（PCR）对微生物纯培养进行核糖体 RNA 测序。扩增 16S rRNA 基因并用 Sanger 法测序（见 7.8 节）。加入的引物与 16S rRNA 保守序列互补（图 11.11c）。

测序方法

假设我们研究的是微生物的纯培养物，尽管我们知道纯培养物对于相对 SSU rRNA 测序不是必要的。为了开始这一程序，先用聚合酶链反应（PCR，见 7.9 节）扩增基因组中编码 16S rRNA 的基因。紧接着，PCR 产物用双脱氧法（Sanger 测序，见 7.8 节）测序（图 11.12），这一步骤既快速又准确。采用与 rRNA SSU 保守序列互补的序列作为 PCR 引物，仅少量细胞样品就能产生大量用于测序的 DNA 样品（图 11.12）。一旦序列被测定，序列数据就能用于电脑分析。

通过 RNA 序列构建系统发育树

对 rRNA 测序，可以利用不同序列分析和系统发育树建立的推算方法。然而，不管用什么程序，原始序列数据必须首先与以前用序列编辑软件排好的序列排成一条线。并不是所有的 rRNA 都有完全相同的长度。因此，排列过程中，由于一序列比另一序列短

所造成的缝隙必须被插入，然后把排好的序列输入到一个形成系统发育树的程序中进行比对分析。

两个应用最广泛的获得系统发育树的方法是距离法和简约性法。用距离法构建系统发育树，先把序列排位，然后通过计算机记录数据库中序列有差异的位置来计算进化距离（evolutionary distance，E_D）（图 11.13）。根据这些数据，可以构造出一个显示数据库中任意两个序列 E_D 的矩阵。接着，把一个统计校正因子引入 E_D，判断在每一给定位点发生多于一种变化的可能性（图 11.13）。一旦计算了这种可能性，就能够获得一个系统发育树，该树上线的长度与进化距离是成比例的（图 11.13c，d）。

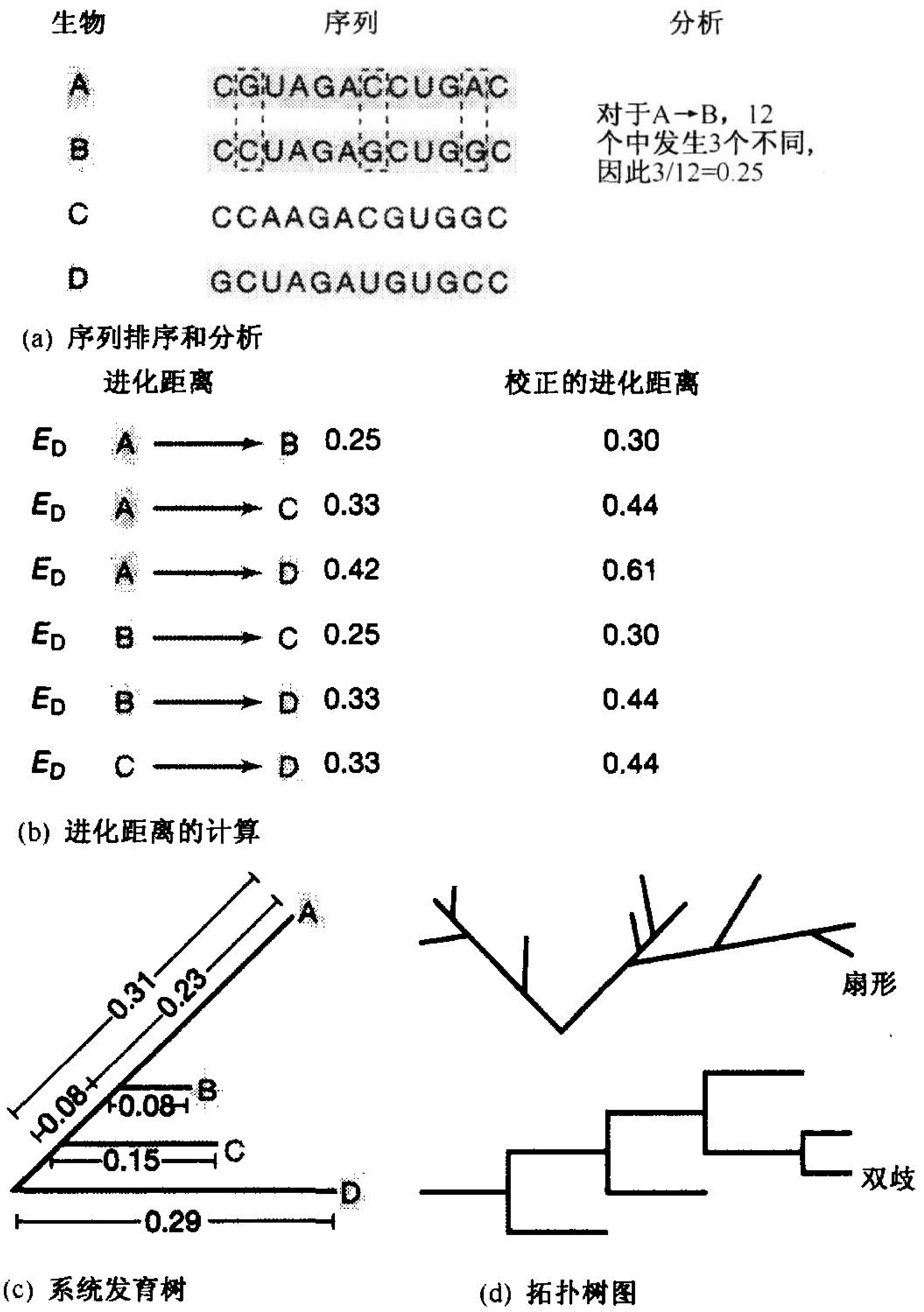


图 11.13　源于 16S rRNA 序列的系统进化距离树的制作。（a）为明显起见，只给出了短序列。（b）中计算的进化距离 E_D 就是任意两个生物 RNA 间不相同序列的比例。为了解释可能发生的恢复到原始基因型的回复突变或附加的发生在相同位点的正向突变，要用到经统计校正的 E_D。（c）中的系统发育树最终是通过计算机对数据的分析而产生的，并给出了最适的一种。（d）能构建不同形式的系统发育树，包括扇形的和双歧的。在任一形式中，分离任意两个生物的分支长度与两个生物的进化距离呈正比。

简约性法（parsimony），是另一个普遍用于系统发育学分析的方法，它基于这样一

个假设获得进化树：在进化分支过程中确实发生了（存在）把来自相同祖先的两个谱系分开所必需的最小序列变化量。像距离程序一样，这一方法需要用一个特殊的数据库计算序列差异的数目。不过和算法操作分析有稍微的不同。基于距离法和简约性法构建的系统发育树还是相似的，虽然相同的数据分别用这两种方法构建的系统发育树的分支顺序可能而且有时候确实不大相同。因此，单一的系统发育树不可能最后确定所研究生物的进化关系。任何一种发育树都仅被认为比较接近某一群体的真正系统发育关系。

概念检查

rRNA 测序是一个比较常规的程序，包括编码 16S rRNA 基因的扩增、测序及其与其他序列的比对分析。两种主要的获取系统发育树的方法是距离法和简约性法。

◆ 什么是进化距离？

◆ 在 rRNA 测序中是怎样利用聚合酶链反应（PCR）的？

11.7 特征序列、系统发生探针和微生物群落分析

由 SSU rRNA 测序技术已经派生出了很多研究工具，包括特征序列和用于微生物生态学及医学诊断的 rRNA 探针。

特征序列

rRNA 序列的计算机分析揭示了特征序列（signature sequence），这种序列是单独存在于某些生物类群中的短寡聚核苷酸。如已经知道了细胞生命各个领域的特征序列（表 11.1）。而且，特征序列指明某一领域里一个独特的群体，或某些情况下指明一个特殊的属甚至是单独的种，这些可以通过计算机显示已排好的序列来鉴别。由于其特异性，特征序列十分有用。例如，特征序列有助于将新分离出的或以前被错误分类的生物置于正确的系统发育类群。不过特征序列最普遍的用途是用来设计称为系统发生探针（phylogenetic probe）的特异核苷酸探针。

表 11.1　定义生物三种领域的 16S 或 18S rRNA 的特征序列

寡聚核苷酸特征序列[a]	大概位置[b]	发生率[c]		
		古生菌	细菌	真菌
CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAAA	910	3	100	0
AAACUUAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

a. Y，任意一种嘧啶；R，任意一种嘌呤；N，任意一种嘌呤或嘧啶。

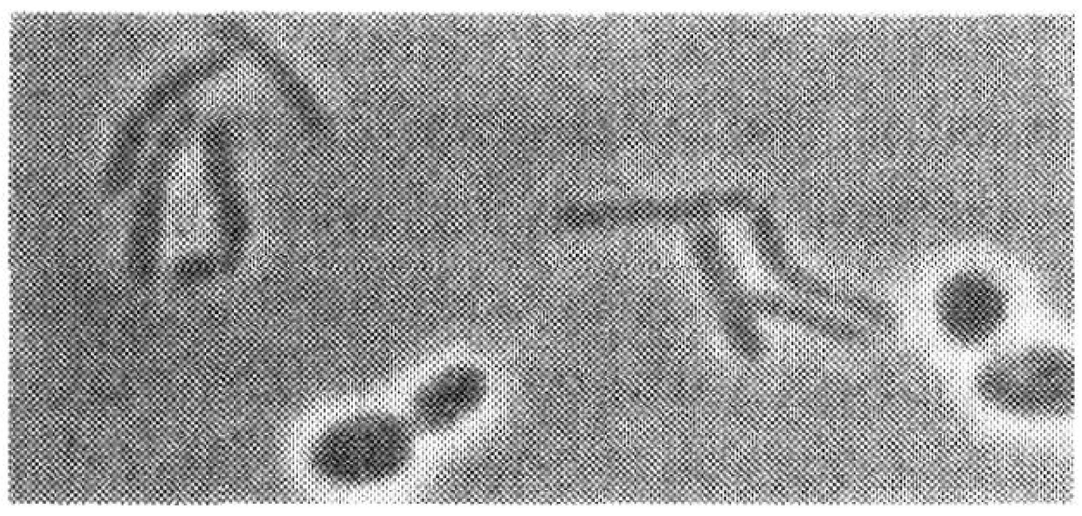
b. 参考图 11.11c 的 16S rRNA 碱基数目图。

c. 发生率是指在每一域中含有此序列的生物体的百分比。

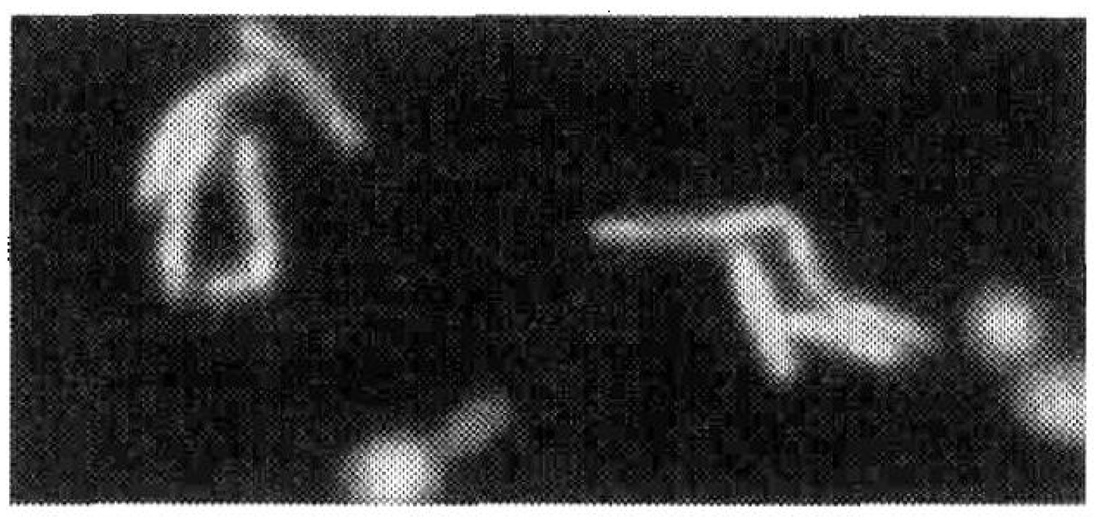
系统发生探针和 FISH

探针是一段可以被标记的、用来与混合物中的互补核酸杂交的核酸链（见 7.7 节）。探针可以是通用的也可以是特定的。例如，合成的通用核糖体 RNA 探针可以与所有生物的核糖体 RNA 的保守序列结合，不管它们是哪个域的。相反，特异的核酸探针可以被设计成只与细菌中的一些种的细胞反应，这是由它们 RNA 中独一无二的特征所决定的（表 11.1）。同样，古生菌及真核生物特异性探针就只能分别和古生菌和真核生物反应。甚至一个域中主要的群体如属或科（见 11.10 节）都可以被特异的探针定位。

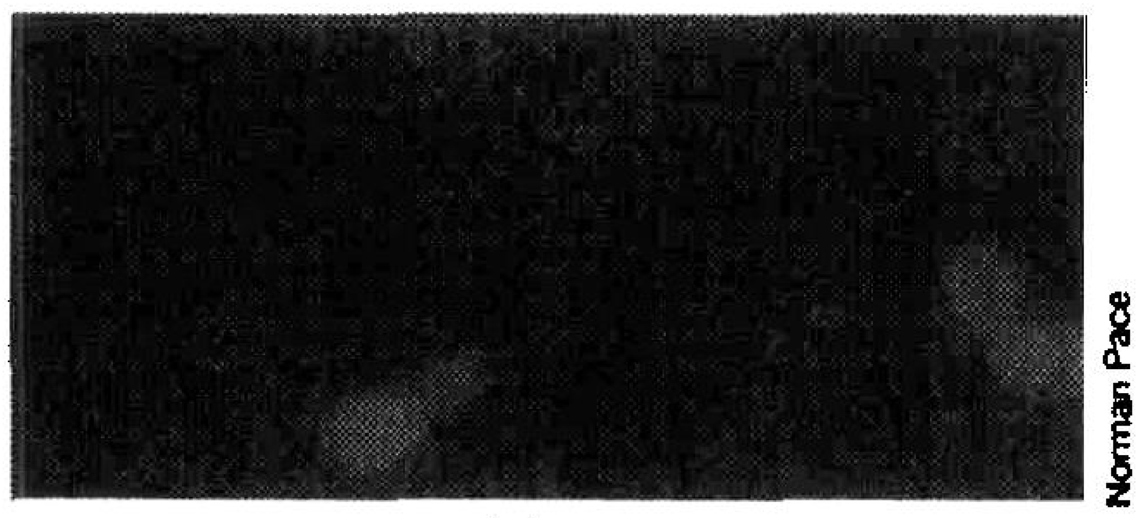
当探针上连接荧光染料时，探针与细胞内核糖体的结合就可在显微镜下观察到（图 11.14）。用适当的试剂处理细胞后，细胞膜就变得具有通透性并且能使探针/染料混合物通过。探针与核糖体 RNA 中的 rRNA 直接杂交后，细胞变得带有荧光并可以在荧光显微镜下观察（图 11.14、图 11.15 和图 11.17）。这种技术被命名为荧光原位杂交（fluorescent *in-situ* hybridization，FISH），它可以直接应用到培养基中的细胞或是自然环境下的细胞（术语原位的意思即“在环境中”）。实质上，FISH 是一种系统发育学的染色方法。



(a)



(b)



(c)

图 11.14 荧光标记的核糖体 RNA 探针：系统发生染色。（a）巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）（杆状，细菌成员）和酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）（椭圆形细胞，真核）细胞的相差显微镜照片（不存在探针）。（b）相同的视野，细胞用黄绿色通用 rRNA 探针染色（此探针与所有领域的生物反应）。（c）相同的视野，细胞用真核探针染色（仅酿酒酵母细胞发生反应）。巨大芽孢杆菌细胞直径大约 1.5μm 而酿酒酵母细胞直径大约 6μm。18.4 节会更详细地介绍遗传染色，包括不是采用 rRNA 序列的染色。

FISH 技术被广泛应用于微生物生态学和临床诊断中。在生态学方面，FISH 可以用于显微镜下的鉴别和直接在环境中追踪生物。FISH 也提供了一种直接用显微镜估算微生物群落组成的方法（见 18.4 节和图 11.15）。在临床诊断方面，FISH 已经被用来快速鉴定患者样本中的特异病原微生物。这种技术取代了需要在培养基中培养生物体的程序。对一个样品的显微镜检可以确定一种病原微生物的存在。在临床诊断中，这种技

术可以使人们更快地诊断出结果并给受到微生物感染的患者予以治疗。反之，分离鉴定技术常常最少需要 24h 甚至更长的时间才可以完成。

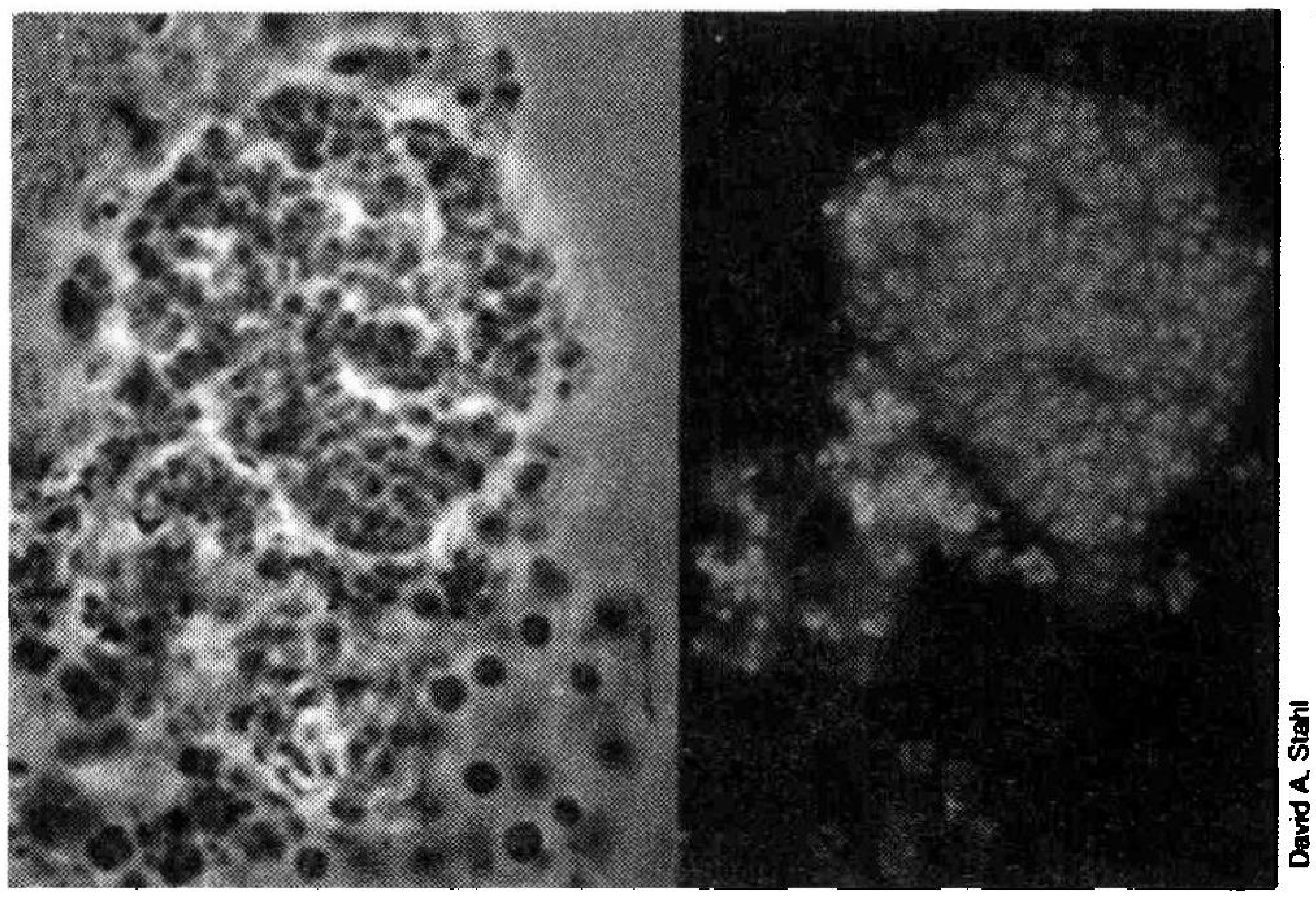


图 11.15 利用系统发生染色法能看见活性污泥颗粒中的硝化细菌。（左）相差显微镜照片。（右）同一视野应用系统发生染色法后的彩色照片。带红色荧光的探针比氨氧化细菌的 16S rRNA 中的特征序列具有特异性（表 11.1），而带绿色荧光的探针比亚硝酸盐氧化细菌的一段序列有特异性。氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌在细菌的系统发生上是关系相近的两个成员（见 12.3 和 17.2 节），而且它们在化能无机自养反应链中互相依赖（见 19.12 节）。

微生物群落分析

通过 PCR 扩增 rRNA 基因不需要实验室中的纯培养物。利用第 18 章中详细描述的方法，可以利用 PCR 技术扩增来自群体中所有成员的编码 SSU rRNA 的基因，从而获得自然微生物群落的系统发生。这些基因可以很容易地被分离、测序及排序。根据这些数据，可以从“环境”序列中获得一个系统发育树，它会显示出群落中存在的不同 rRNA。从这个树中，特定的生物体可以被推测出来，即使它们没有被真正地培养或鉴定。这种微生物群落分析（microbial community analysis），就像它的名字一样，是如今微生物生态学研究中的一个主要进步，并且揭示出了许多微生物群落结构和微生物间的相互作用的重要特征（详见第 18 章）。

概念检查

特征序列是在 rRNA 分子里发现的短寡聚核苷酸，能用来确定某一特殊的生物或者某些相关生物组成的群体。特征序列能用来设计特异的系统发生探针，这些探针对 FISH 或者微生物群落分析很有用。

◆ 利用表 11.1 中的数据，选择一个可以区分开古生菌和细菌细胞的特异的系统发生探针。

◆ 显微镜下寡聚核苷酸探针怎样变得可见？这项技术叫什么？

Ⅲ 微生物进化

11.8 从 rRNA 序列获得的微生物系统发育史

以前生物学家把生物世界划分为 5 个界：动物、植物、真菌、原生生物和原核生物。另一方面，分子系统发育揭示出现在的五界学说并不能代表 5 个主要的进化谱系。相反，在第 2 章提到地球上的细胞生物进化成 3 个主要的谱系（域），其中的 2 个域是仅由原核细胞组成的微生物。第三个包括真核生物（图 11.16）和所有原来五界系统中除原核生物以外的生物。两个原核生物群体是细菌（*Bacteria*）和古生菌（*Archaea*），真核域称为真核生物（*Eukarya*）（图 11.16）。这些术语定义了生命的 3 个域(domain)，域是最高的生物分类单位。因此，五界系统中的动物、植物、真菌、原生生物都是属于真核生物领域。

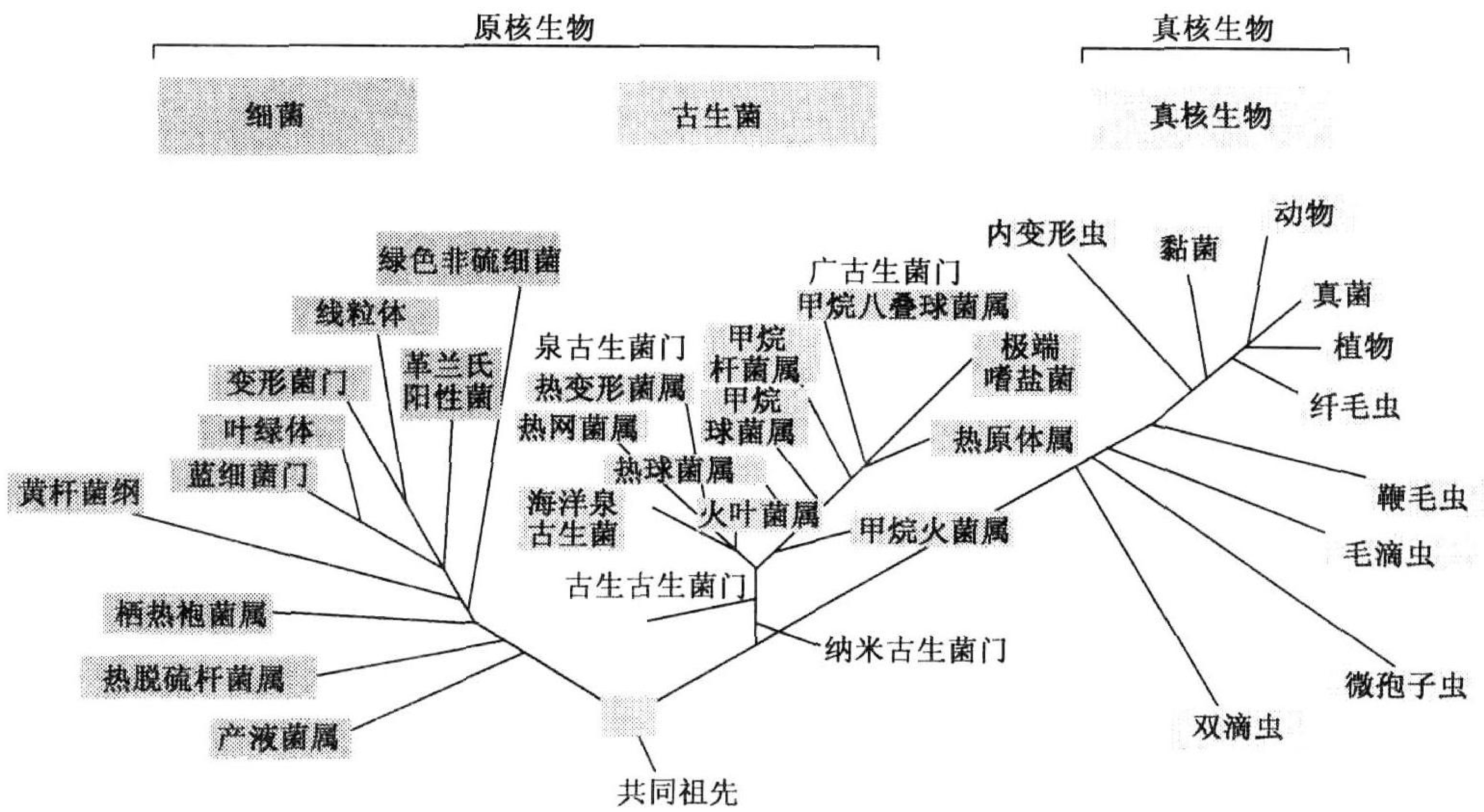


图 11.16　通过比较核糖体 RNA 测序所测定的普通系统发育树。每个域仅显示了一些重要的生物或谱系。详细的域系统树参考图 12.1、图 13.1 和图 14.20。3 个域中，两个（细菌和古生菌）仅包含原核代表。

生命的通用系统树

通用系统树（universal phylogenetic tree）（图 11.16）是生命的路线地图。它展示了所有细胞生物的进化历史并且清楚地揭示了生命的 3 个域。通用系统树的根代表了进化时间的一个点，地球上所有的现存生命在此时拥有一个共同祖先：原始祖先（universal ancestor）。

全基因组测序确认了古生菌的存在，古生菌拥有一套独特的序列，在细菌界和真菌界所包括的三个一般意义上的域均没有与之对应的序列。但是同样重要的是，一些基因

组数据显示许多基因是细菌、古生菌、真核生物所共享的。根据原始祖先的概念，这些看似矛盾的发现是怎样协调的呢？

一种假设解释了这种现象：在生命起源的早期，所有域发生分支之前，水平基因转移（第10章）广泛存在。在这个时期内，能引起额外协调的编码蛋白质的基因，例如，指导细胞核心功能——转录和翻译的基因来自于一个共同的祖先细胞并且在这些原始的生物群体中转移。如果这是真的，就能解释为什么所有细胞（不管属于哪一个域）共享许多核心功能基因，正如基因组分析所显示的，同时也能预计是否所有细胞拥有一个共同的祖先（图11.16）。

但是，怎样解释从全基因组测序中观察到的遗传差异呢？随着时间推进，进一步的假设：进化出了自由水平转移的障碍，也许来自于生活环境的选择（因此产生了生殖隔离）或者是由于结构或酶的障碍（如限制性内切核酸酶）在某些方面阻碍了基因的自由交换。结果，最初遗传混杂的群体慢慢演化成最初的进化谱系（图11.16）。随着每个谱系的继续进化，一些特定的生物特征在每一个群体内固定下来。现在，经过38亿年的微生物进化（图11.10），我们看到了细胞进化的主要结果：一方面细胞生命的3个域共享某些特征；另一方面，也展示了它们自己不同的进化历史。

原始生物与现代生物的对比

现存的所有生物体和进化树上描述的生物（图11.16）均不是原始的生物。所有现存的生命形式都是现代生物，它们很成功地适应了它们的小生境。某些特定生物体在表型上确实和原始生物相似，超嗜热原核生物（最适生长温度高于80℃）就是一个很好的例子。例如，产液菌属（*Aquifex*）和甲烷火菌属（*Methanopyrus*）分支上的生物分别与细菌和古生菌域的根部很相近（图11.16）。它们都能在非常高的温度下生存（见12.38节和13.6节），与它们亲缘关系近的生物生活在相当热的早期地球上。不管怎么说，早期分支上的生物都不是它们原始的样子了。它们是现代生物，从生命树更深层分支的生物获得的表型较少，如变形杆菌（细菌）或者极端嗜盐菌（古生菌）（图11.16）。

细菌

在细菌中，到目前为止已发现至少有40个门（phylum，复数是phyla），一些比较重要的在图11.16的系统发育树上已有显示。很多门仅仅根据环境顺序定义（见11.7节和图12.1）。细菌域里的一些细胞系以前是根据一些表型特征如形态学或生理学特征区分的，这里最好的例子是螺旋体（spirochete）和蓝细菌（cyanobacteria）。但是大多数门有这些种组成，虽然它们许多是形态发生相近的生物，却没有生理学的依据。这里变形细菌（proteobacteria）是一个很好的例子；存在于这一群体里的生理学混合体现了所有已知的微生物生理。这些清晰地表明，生理和形态并不是严格一致的。

真核细胞器起源于细菌里的生物。如普通系统发育树所示，线粒体起源于变形细菌，它是一个主要的细菌群体（图11.16），尤其是来自于根瘤菌和立克次氏体的一些亲缘相近的生物。有趣的是，像线粒体一样，这些生物胞内都存在相似的结构，在植物细胞（见19.21节和19.22节）和动物细胞（见12.13节和27.3节）中都存在。叶绿体来源于蓝细菌门（图11.16），可以这样推测，是由于蓝细菌和叶绿体都能进行光合作用。

古生菌

从系统发育的角度来讲，古生菌包括 4 个门：泉古生菌门（Crenarchaeota）、广古生菌门（Euryarchaeota）、古生古生菌门（Korarchaeota）和纳米古生菌门（Nanoarchaeota）（图 11.16）。分支接近系统发育树根部的是超级嗜热泉古生菌，如热变形菌属（*Thermoproteus*）、火叶菌属（*Pyrolobus*）和热网菌属（*Pyrodictium*）（图 11.16）。它们之后是广古生菌、产甲烷的原核生物和极端嗜盐菌；热原体属（*Thermoplasma*），一种嗜酸、嗜热、无细胞壁的原核生物，与后面的这些群体关系较近。

广古生菌谱系上的一些分支（图 11.16 和图 13.1）仅仅是通过来源于环境中群落样品的核糖体基因来确定的（见 11.7 节，18.5 节和 18.6 节）。有趣的是，这些序列来源于生存在海洋中的生物，包括比温泉和深海温度低得多的南极海水中的泉古生菌（见 13.8 节）。另外的泉古生菌序列来源于泥土和湖泊的群落样品。我们将在 13.8 节中详细介绍这些冷适应性的泉古生菌。

和冷适应性的泉古生菌一样，古生菌中的一个以前叫做古生古生菌的门已经被鉴定，是通过对国家黄石公园（美国）里一个不常见的热温泉的微生物群落分析得到的。包括古生古生菌（通过系统发育染色鉴定的，图 11.17）的稳定混合培养物可以在实验室生长。从实验室培养物可清晰地看到古生古生菌是超嗜热的。因此它们与超嗜热的泉古生菌门的一些生物可能具有相似的代谢特征（见 13.8～13.10 节）。

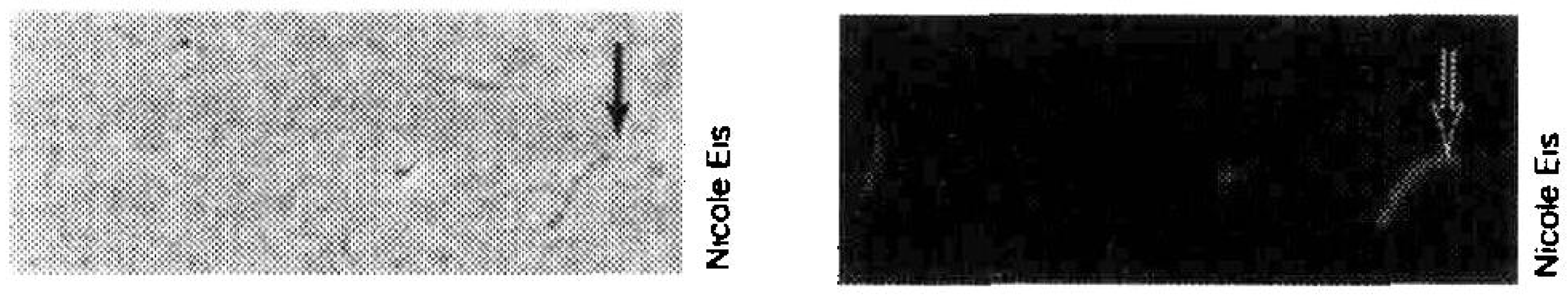


图 11.17　用系统发育学染色的方法鉴定古生古生菌门的细胞。（a）包括古生古生菌细胞的富集培养物的相差显微照片（箭头）。（b）与（a）中所示是同一视野的荧光显微照片，用古生古生菌门 16S rRNA 设计的特征序列（见 11.7 节）进行系统发育学染色。视野中两个红色的长杆菌细胞就是古生古生菌。

处于古生古生菌基部的是纳米古生菌，它是一个相距很远仅有一个代表生物——纳米古生菌的群体。这种微小的细菌是一种称为 *Ignicoccus* 的寄生菌，而且拥有所有已知原核生物的最小的基因组（见 13.11 节和 15.4 节）。我们将在第 13 章中详细讨论纳米古菌和古生菌的所有门。

真核生物

真核生物中各个种系统发育树的产生源于 18S rRNA 测序比对，18S rRNA 存在于真核细胞质的核糖体中，是 16S rRNA 的功能对应物。早期的真核生物和现在的微孢子虫（microsporidia）和双滴虫（diplomonads）相似。这些生物是寄生虫，与真核生物包括从微生物到人类的不同群体共同生活［如病原体贾第鞭毛虫（见 28.6 节）属于双滴虫］。有趣的是，尽管这些生物含有一个膜封闭的细胞核，但微孢子虫和双滴虫却没有线粒体。它们与下述类型的细胞相似，即该细胞可能最早接受了稳定的内共生体（见

14.5节，14.9节和图11.9）（在查明微孢子虫的真正系统发育学位置上出现了一些问题，这将在14.9节中讨论）。

大部分系统发育导出的真核生物包括多细胞生物，到达顶点的是结构复杂的大型真核生物——植物和动物（图11.16）。当化石记录与真核系统发育树相比较时，快速进化辐射的开始可追溯到15亿年前。地球化学证据表明，在地球历史上此时正是大气中氧气积累到一个显著水平的时期（图11.8）。这样，有氧环境的出现和随后形成的臭氧层（臭氧层能快速增加无性繁殖的表面栖息物的数量）很有可能引发真核生物的迅速多样化。我们将在第14章讨论主要的微生物真核群体及它们的生物化学。

概念检查

地球上的生命沿着3个主要的路线进化，这3条路线称为域，都来自一个共同的祖先。每个域包括几个门。域中的2个——细菌和古生菌保持原核，而第3条线路——真核域，进化成了现代真核细胞。

◆ 普通系统发育树如何支持早期地球非常热这种观点?

◆ 普通系统发育树如何支持如图11.9所示的内共生假说?

11.9 生物各个域的特征

尽管原始域（细菌、古生菌和真核生物）的界定是基于比较rRNA序列（遗传学标准)，但是每个域也能被一些特定的表型特征所描述。其中的一些特征是某个域所特有的，而其他特征则只在另外两个域中出现。在这里我们将对系统发育的主要表型特征作一个综述。

细胞壁

实际上所有细菌都有含有肽聚糖的细胞壁（见4.8节)。目前所知唯一的例外是浮霉状菌属（*Planctomyces*）-小梨形菌属（*Pirella*）类群（见12.28节），其细胞壁是由蛋白质组成的；还有就是衣原体属（*Mycoplasma*）-支原体属（*Chlamydia*）类群，它们都缺少细胞壁（见12.21节和12.27节)。因此肽聚糖可以被认为是细菌种类的“特征”分子（分析肽聚糖时实际上测定的是胞壁酸，因为它是肽聚糖的特有成分；表11.3)。

真核生物和古生菌细胞缺少肽聚糖。如果真核生物有细胞壁，那么它们通常是由纤维素和几丁质组成的（见第14章)。已知古生菌中有各种不同化学成分的细胞壁，从肽聚糖类似物假肽聚糖到由多糖、蛋白质或糖蛋白组成的细胞壁（见4.8节)。因此，微生物细胞壁的化学成分存在很大的多样性，但是区分细菌和古生菌最有用的方法是：是否存在肽聚糖。

脂类

膜脂的化学本质是区分古生菌和细菌的一个重要特征。细菌和真核生物合成的膜

脂，其主链的组成是脂肪酸以酯键与甘油分子相连（图 11.18）。虽然它们的脂肪酸的本质有很大区别，但是连接甘油的酯键却是一个重要的界定特征。相比而言，古生菌的脂类是由醚键连接的分子组成（图 11.18）。在酯键连接的脂类中，通常脂肪酸是直链（线性）分子；而在古生菌中，存在着替代脂肪酸的植烷基型或双植烷基型的长链分支碳水化合物，而且它们以醚键与甘油相连。

在脂类的系统发育模式上也存在一些例外。例如，属于嗜热硫还原细菌的热脱硫杆菌属（*Thermodesulfobacterium*）（见 12.36 节）及另外的一些硫还原细菌（见 12.18 节），还有丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）的一些种类，它们含有以醚键连接的脂类。古生菌中不含有以酯键连接的脂类。

在膜结构方面，一些古生菌，尤其是超嗜热种类的古生菌，形成的是脂单分子层（lipid monolayer）而不是脂双分子层（lipid bilayer）（见 4.5 节和图 4.20）。在这些生物所生存的高温条件下，脂双分子层比脂单分子层更容易变性。甘油和碳水化合物侧链之间的醚键（图 11.18）结合到单层膜结构上，以保护这些极端古生菌的膜不被它们所生存的环境破坏。

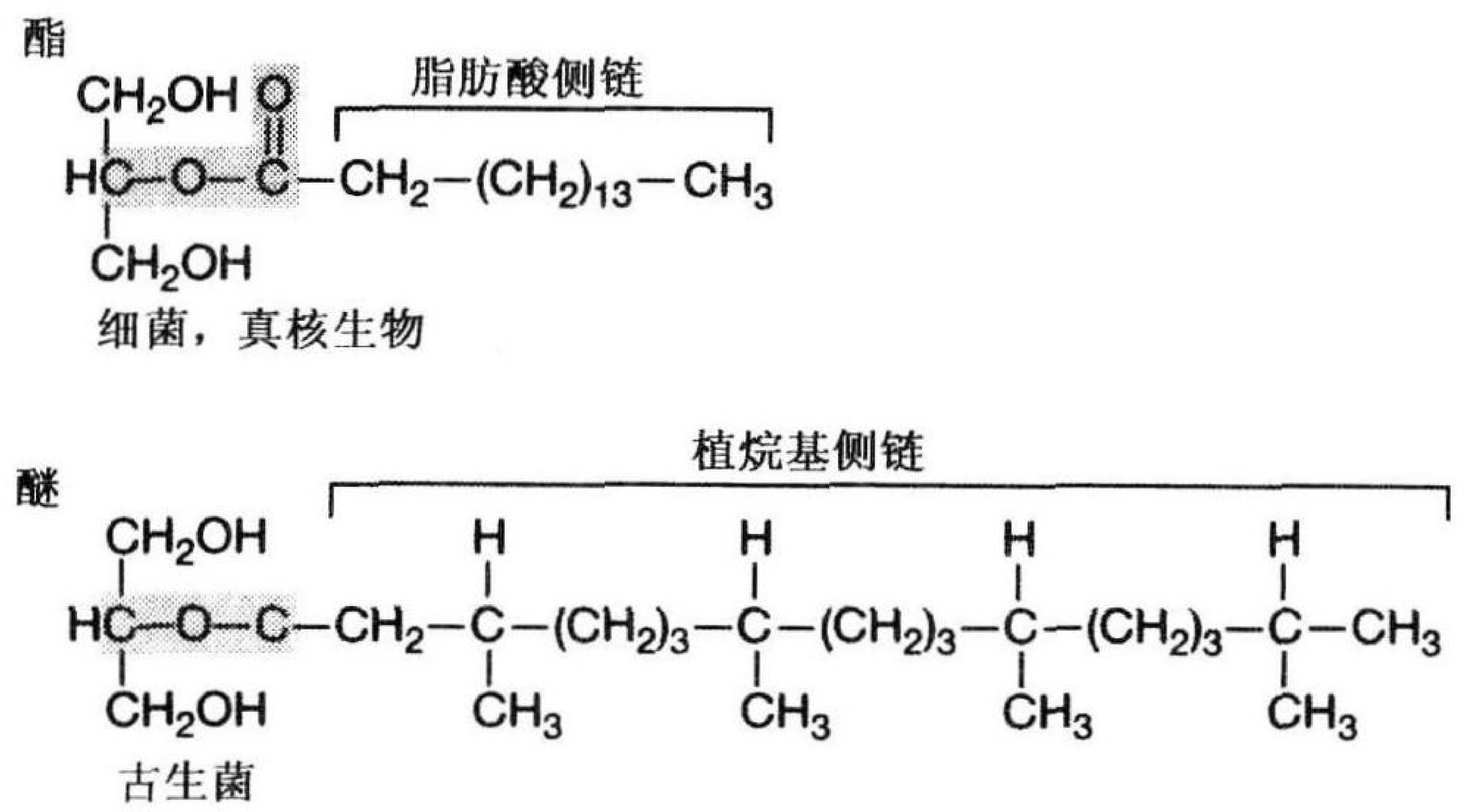


图 11.18 细菌、真核生物和古生菌的脂类。在细菌和真核生物中，脂类含有以酯键和甘油连接起来的脂肪酸（图中所示为软脂酸）。在古生菌中，脂类的侧链是以醚键与甘油相连的分支的碳水化合物（图中所示为植烷基，C_{20}）。植烷基由异戊二烯聚合而成（图 4.18c）。

RNA 聚合酶

在所有生物中，转录都是由依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶来完成的；DNA 是模板，RNA 是产物。细菌细胞含有一种单一类型的 RNA 聚合酶，其四级结构相当简单。这就是典型的含有 α、β、β′和 δ4 个多肽的 RNA 聚合酶，在有活性的 RNA 聚合酶中这 4 个多肽互相结合的比例是 2∶1∶1∶1（图 11.19，见 7.10 节）。

古生菌的 RNA 聚合酶在结构上比细菌的更复杂。古生菌一些种的 RNA 聚合酶含有 8 个或更多的多肽，更像真核生物的 RNA 聚合酶模式（图 11.19）。真核生物主要的 RNA 聚合酶（有 3 种）含有 10～12 个多肽，各多肽相对的分子大小与超级嗜热古生菌 RNA 聚合酶中多肽的分子大小非常近似（图 11.19）。因此，从系统发育学特征来说，$\alpha_2\beta\beta'\delta$ 聚合酶用于细菌分析；多于 4 个亚基的 RNA 聚合酶不能用于系统发育分析，除非说明它们不属于细菌。

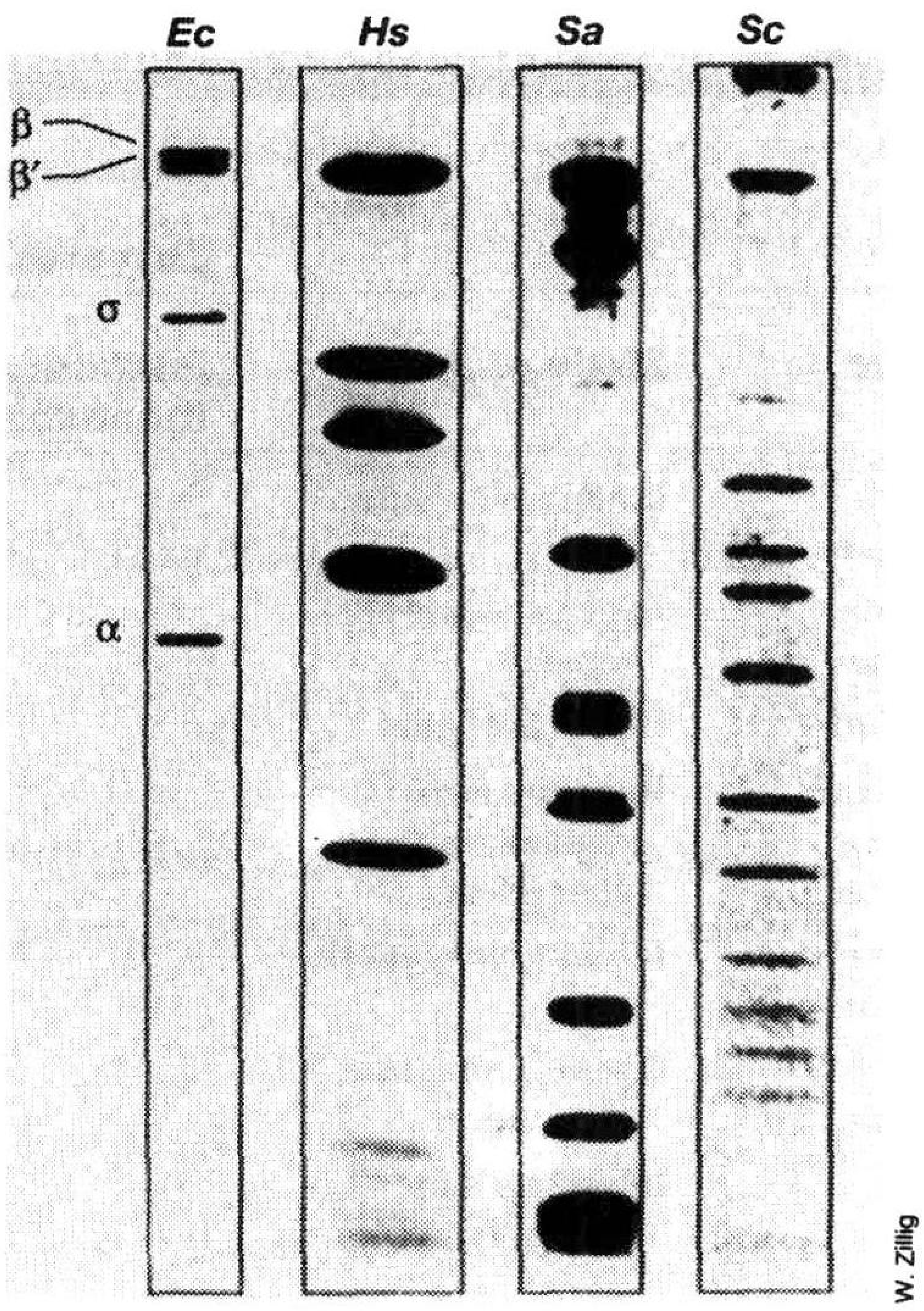


图 11.19 **RNA 聚合酶和系统发育。**3 个域代表物种的 RNA 聚合酶：Ec 大肠杆菌（细菌）；Hs 盐沼盐杆菌（广古生菌、古生菌）；Sa，嗜酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）（泉古生菌门、古生菌）；Sc 酿酒酵母菌（真核生物）。纯化的 RNA 聚合酶的组分经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。最大的多肽亚基在上面，最小的亚基在下面。只有属于细菌的成员含有简单的 RNA 聚合酶（4 个多肽）。

蛋白质合成的特征

由于 rRNA 序列及蛋白质合成因子的不同，3 个域的代表生物在蛋白质合成机制的某些方面存在差异。尽管古生菌和细菌的核糖体大小相同（70S，与真核生物细胞质中的 80S 核糖体相比较而言），古生菌蛋白质合成的一些步骤更与真核生物相像而不同于细菌。翻译通常从一个特定的密码子开始，因此将它称为起始密码子。细菌中该起始密码子（AUG）需要一个 tRNA 起始物的协助，该 tRNA 含有一个修饰的甲硫氨酸残基——甲酰甲硫氨酸（见 7.16 节）。相比而言，在真核生物和古生菌中，tRNA 起始物携带的是一个没有修饰的甲硫氨酸。

白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）产生的外毒素是真核生物蛋白质合成中的一种有效抑制剂，这是因为该外毒素能够对延伸因子进行 ADP-核糖基化作用（即将 ADP 加到延伸因子上），而延伸因子对于核糖体在 mRNA 上的移位是必需的；修饰的延伸因子无活性（见 21.10 节）。白喉毒素也能抑制古生菌的蛋白质合成，但是对细菌不起作用。

影响细菌蛋白质合成的许多特异性抗生素并不影响古生菌或真核生物的蛋白质合成。表 11.2 给出了 3 个域的代表生物对不同蛋白质合成抑制剂的敏感性（见 7.16 节），表中对抗生素的分类是根据其阻断不同域生物蛋白质合成的作用方式。

表 11.2 3 个域代表生物对不同蛋白质合成抑制剂的敏感性[a]

抗生素	作用方式	古生菌		细菌	真核生物
		广古生菌门	泉古生菌门		
		热自养甲烷杆菌（*Methanobacterium thermoautotrophicum*）	嗜热酸硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）	大肠杆菌（*Escherichia coli*）	酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）
梭链孢酸，稀疏霉素	抑制延伸步骤	+	−	+	+
茴香霉素，水仙环素	抑制肽酰转移	+	−	−	+
亚胺环已酮	阻断起始	−	−	−	+

续表

抗生素	作用方式	古生菌		细菌	真核生物
		广古生菌门	泉古生菌门		
		热自养甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)	嗜热酸硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*)	大肠杆菌 (*Escherichia coli*)	酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
红霉素,链霉素,氯霉素	增加错误率及其他效应	−	−	+	−
维及尼霉素,粉霉素	抑制延伸步骤	+	−	+	−
新霉素,嘌呤霉素	导致预成熟终止	+	+	+	+
利福霉素	抑制 RNA 聚合酶 β 亚基	−	−	+	−

a. A＋表示蛋白质合成（及生长）被抑制。

这些结果表明，古生菌与真核生物细胞核糖体蛋白质之间功能上的相似程度比它们与细菌细胞核糖体蛋白质功能上的相似程度大得多。这些结果进一步支持了普通系统发育树上关于不同领域间相互关系的结论（图 11.16）。

域的其他特征

大量其他的表型特征、生理及另外一些特征能用来在域水平上区分不同的生物，表 11.3 总结了这些特征。查阅此表时应该理解这一点，在给定的域中并不是所有的特征都普遍存在。例如，基于叶绿素的光合作用仅仅是细菌和真核生物（存在于后者中仅是由于能光合作用的内共生细菌，图 11.9）中某些代表生物的特征。相对而言，其他的一些区分特征，如细菌的细胞壁中存在肽聚糖则是或者说几乎是普遍存在的。

表 11.3　细菌、古生菌和真核生物的主要鉴别特征小结[a]

特征	细菌	古生菌	真核生物
形态学和遗传学特征			
原核细胞结构	是	是	否
DNA 以共价闭合环状形式存在	是	是	否
存在组蛋白	否	是	是
膜封闭的细胞核	不存在	不存在	存在
细胞壁	存在胞壁酸	不存在胞壁酸	不存在胞壁酸
膜脂	酯键	醚键	酯键
核糖体(大小)	70S	70S	80S
tRNA 起始物	甲酰甲硫氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸
多数基因中的内含子	否	否	是
操纵子	是	是	否
mRNA 加帽和 poly A 加尾	否	否	是
质粒	是	是	极少
核糖体对白喉毒素的敏感性	否	是	是

续表

特征	细菌	古生菌	真核生物
RNA 聚合酶(图 11.19)	一种(有 4 个亚基)	几种(每种有 8～12 个亚基)	三种(每种有 12～14 个亚基)
需要转录因子(见 7.11 节)	否	是	是
启动子结构(见 7.10 节和 7.11 节)	−10 和−35 序列(Pribnow 框)	TATA 框	TATA 框
对氯霉素、链霉素和卡那霉素的敏感性	是	否	否
生理/特殊结构			
产甲烷	否	是	否
异化性的将 S^0、SO_4^{2-} 还原成 H_2S,或将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+}	是	是	否
硝化作用	是	否[b]	否
反硝化作用	是	是	否
固氮作用	是	是	否
基于叶绿素的光合作用	是	否	是(在叶绿体中)
基于视紫红质的能量代谢	是	是	否
化能无机营养(Fe、S、H_2)	是	是	否
气泡	是	是	否
合成由聚 β-羟基烷酸组成的碳储存颗粒	是	是	否
在 80℃以上生长	是	是	否
在 100℃以上生长	否	是	否

a. 注意，对于许多特征来说在一个域内仅一些代表生物显示出这些特征；

b. 对海水中原核生物环境基因组学的研究强有力地支持存在硝化古生菌这一观点。

概念检查

虽然对生物 3 个域的定义最初是通过 rRNA 测序，但随后的研究表明，它们在其他许多方面也存在差别。尤其是细菌和古生菌在细胞壁和脂类化学方面及转录和蛋白质合成的特征方面有着广泛的差异。

◆ 细菌和真核生物的脂类与古生菌的脂类有何差别?

◆ 哪个域生物产生的 RNA 聚合酶与真核生物产生的 RNA 聚合酶极其相似? 哪些系统发生的证据支持这一点?

Ⅳ 微生物分类学及其系统发生关系

微生物学中一个重要的学科是微生物分类，或叫分类学。分类使微生物学家能够对比不同微生物之间的关系，从而发展出一种系统的微生物命名程序。接下来的 4 节中我们讨论细菌分类学的基本概念。

11.10 经典分类学

分类学（taxonomy），即关于分类的科学，由鉴定（identification）和命名（nomenclature）这两个主要的分支学科组成。区分分类学（本章的主要主题即在于此）和系统发生（phylogeny）很重要，这两个术语代表着不同的含义。

传统上细菌分类学依赖于表型分析。这些表型包括：某个生物看起来像什么，它的能量代谢，它的酶及其他的一些特征。尽管原核生物的系统发育关系由前面几节讨论的遗传型分析产生，但是表型分析在细菌的鉴定和分类上继续起重要的作用。尤其是在现实情况下鉴定是其最后的手段时，如在微生物学临床分析中。在本节中，我们讨论经典的细菌分类学，接下来的一节总结了一些在细菌分类中十分有用的分子生物学方法。

在经典的细菌分类学中，会测定几种表型特征，得到的数据用于把一种生物在分类学的阶梯上从种分到域（表 11.5 和表 11.6）。在这一点上分类学的评估被广泛应用，包括形态、营养和生理，以及生活习性。表 11.4 把这些重要的分类学评估种类总结为详细的题条。

表 11.4　分类学评估的一些表型特征

主要分类	组成
Ⅰ. 形态学	形状；大小；革兰氏反应；鞭毛检测，如果存在的话
Ⅱ. 运动性	鞭毛运动；滑行；气泡运动；不运动
Ⅲ. 营养和生理学	能量转换机制（光合型，化能有机营养型，化能无机营养型）；和氧的关系；温度、pH 及盐的需要/耐受；对不同碳源、氮源和硫的利用能力；对生长因子的需求
Ⅳ. 其他因素	色素；细胞内含物或表层；致病性；抗生素敏感性

为了鉴定一种生物，必须评估它的几种表型特征，从一般到特别。这种方法的例子在图 11.20 中显示，用形态特征和生理特征测试来鉴定（表 11.5）。通过集中几个单独特征的数据，逐一考查列表直到做出一个肯定的鉴定（图 11.20）。

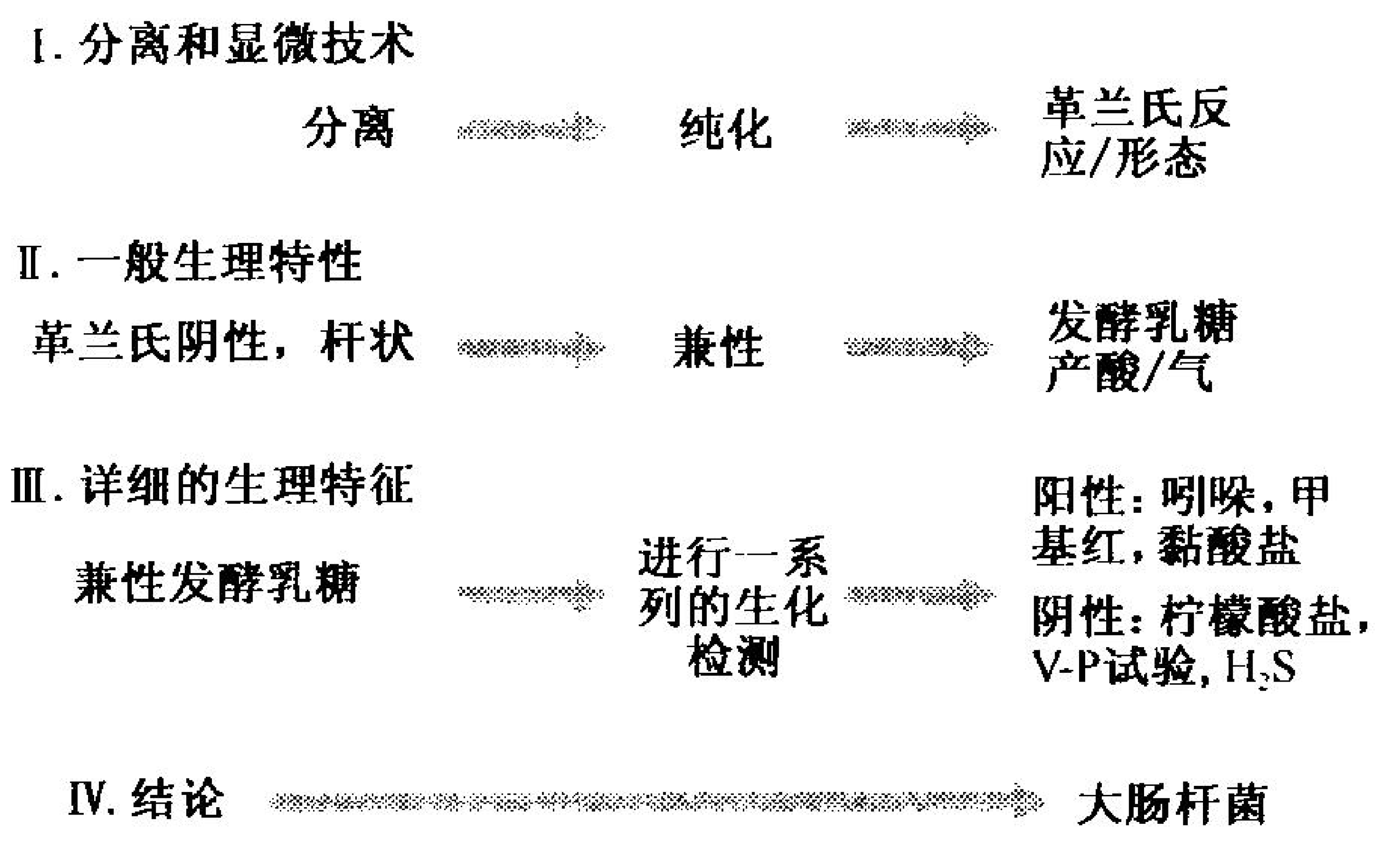


图 11.20　可能用于鉴定一株新分离肠道细菌的方法举例。这个图表用的是经典的微生物学方法（给出的例子说明了能用于鉴定大肠杆菌的程序）。注意，这里所做的分析大部分需要纯培养，而且鉴定中使用唯一的表型标准。第 24 章中给出生化测试的描述（见 24.2 节、表 24.3 和图 24.7）。

GC 比率

某一生物的基因组 DNA 的 GC 比率（GC ratio）是一个在得出分类学结论时能提供信息的特征。GC 百分比被定义为：一个生物的 DNA 中鸟嘌呤加上胞嘧啶所占的百分比。有几种方法能测定这个百分比，包括测定 DNA 的熔解温度（见 7.2 节）或者色谱方法。

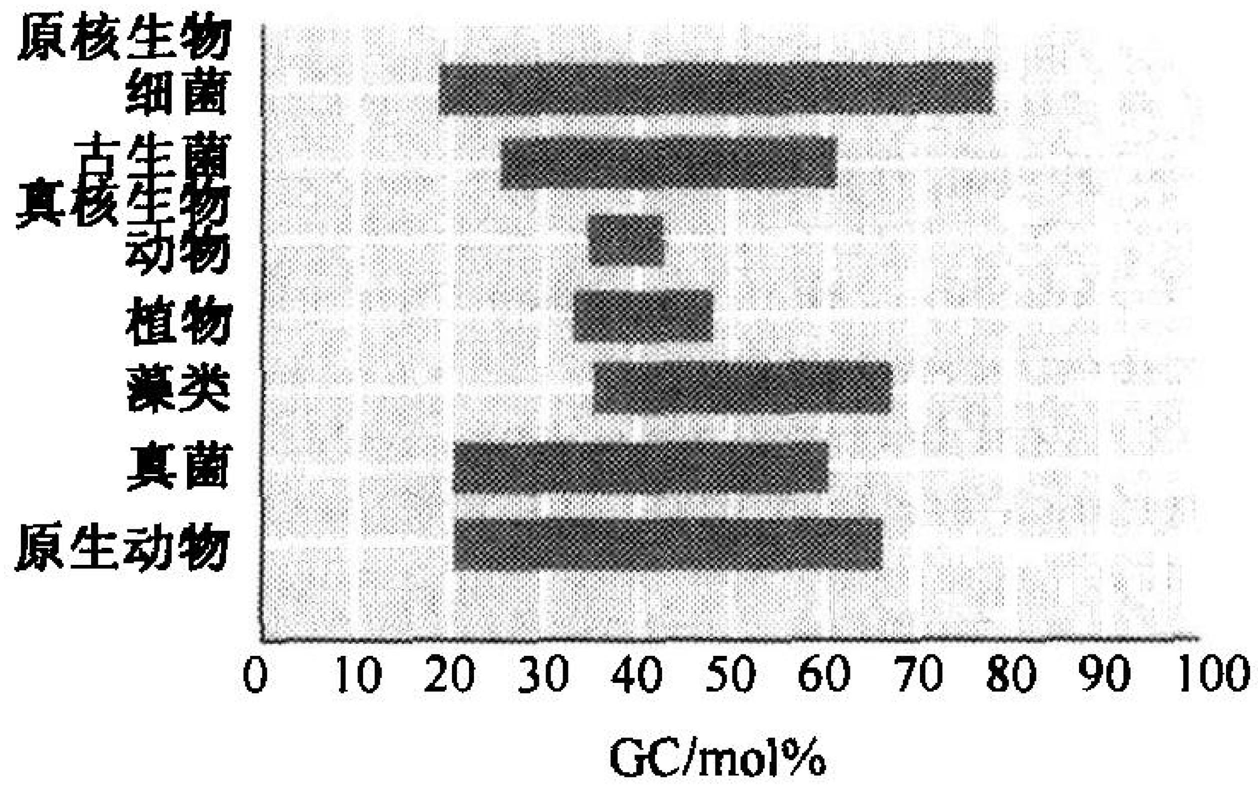


图 11.21 不同生物基因组 DNA 碱基组分的范围。注意最宽的 GC 百分比范围存在于细菌中。

已知原核生物中 GC 百分比在一个很宽的范围内变化，从低至 20% 到高达 80%；这个范围比真核生物稍微宽一些（图 11.21）。已经测定了大量生物的碱基组成，根据情况，关于某一生物的 GC 百分比的知识可能是有用的。比如，两个生物可以具有相同的 GC 百分比却极不相关（不论在分类学上还是在系统发育上），这是因为每一碱基组成的 DNA 其碱基序列可能有很多种。既然这样，相同的 GC 百分比在分类学上就毫无意义。相对而言，如果两种生物 GC 百分比的差异大于 5%左右，它们的 DNA 相同的序列就很少。因此，不可能关系很近。

概念检查

传统的细菌分类学很大程度上依赖于对生物表型特征的分析。对生物 DNA 的 GC 碱基百分比的测定是这个程序的一部分。

◆ 列举 3 种能区分细菌的表型特征。

◆ 两种生物具有极其相似的 DNA GC 百分比却仅有极少数相同的基因，这是为什么？

11.11 化学分类学

分子分类学，也叫做化学分类学（chemotaxonomy），包括对一个或者多个细胞成分的分析。化学分类学方法中经常使用的有：基因组 DNA∶DNA 杂交、核糖分型、多位点序列分型和脂类图谱。

DNA∶DNA 杂交

某一给定生物的 GC 百分比描述的是其基因组 DNA 中各种核苷酸的比例，但是却绝对不能提供关于这些核苷酸序列的任何信息。当然，序列是至关重要的，因为如果两种生物的 DNA 有很多相同的核苷酸序列，它们可能含有很多高度相似（如果不是完全相同）的基因。因此这两个 DNA 可以互相杂交，杂交结果与它们基因序列的相似性成比例。基因组杂交（genomic hybridization）衡量了两个 DNA 序列的相似程度，而且当

rRNA 测序不能确定的时候基因组杂交对于区分关系非常接近的生物很有用。

我们在 7.7 节中讨论了核苷酸杂交的理论及方法。在实际的杂交实验中，分离自一种生物的 DNA 用^{32}P或者^{3}H进行放射性标记，剪切成相对小的片段，加热使之变性，并与分离自第二种生物以同样方法处理的过量未标记的 DNA 混合在一起（图 11.22）。然后将 DNA 混合物降温退火，并将双链 DNA 与未杂交的 DNA 分离。随后，检测杂交 DNA 的放射活性，并与对照进行比较，对照是 100%的杂交度（图 11.22）。除了放射性，还有很多非放射性的 DNA 标记可以利用，这些非放射性标记的优势在于杂交实验后不产生放射性垃圾。

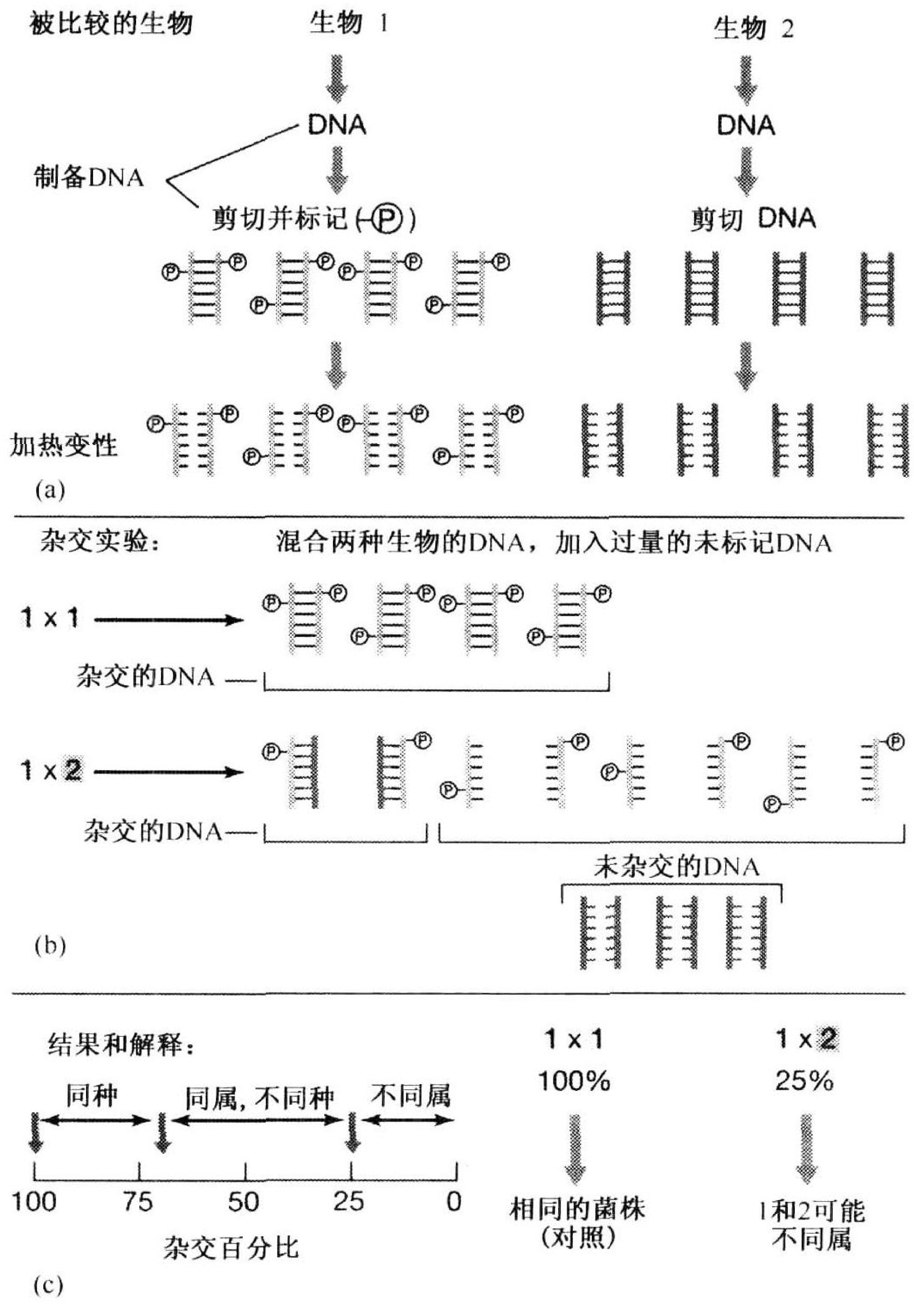


图 11.22　用作分类工具的基因组杂交。(a) 从待测生物分离 DNA。其中的一个 DNA 进行标记（此图是生物 1 的 DNA 中的放射性磷酸）。(b) 实际的杂交试验。加入过量的未标记 DNA 以防止标记 DNA 的自身退火。杂交后，将杂交的 DNA 与未杂交的 DNA 分离，然后只检测杂交 DNA 的放射活性。(c) 结果。对照的放射活性是 100%的杂交度。

至于将两个生物归入相同的分类等级需要多大的 DNA 杂交程度，这并无一定的标准。不过，杂交值≥70%的两个菌株被认为是同一个种。相对而言，杂交值至少是

25%的两个生物才能被认为是一个属（11.12 节有实用的细菌属和种的鉴定）。例如，两个关系很远的生物的 DNA 杂交——梭菌属（革兰氏阳性）和沙门氏菌（革兰氏阴性），仅仅显示本底杂交，10%或更少（图 11.22）。

对于显示两个生物基因间的细微差别，DNA：DNA 杂交是一个灵敏的方法，因此可以用来区分关系很近的生物。确实，在分类学研究中基因组杂交的一个普遍应用是测试两个被怀疑是不同种类的生物，即使 SSU rRNA 测序和表型分析并没有揭示出它们存在重大差异。

当全基因组测序可以利用时，它使杂交分析变得不必要了。一个给定细菌的基因组测序后，它的全部基因的分类可以与另外已经测序的细菌相比较（见第 15 章）。然而，目前仅几百种原核生物的基因组被完全测序，大多数情况下上述的比较是不可能的。今后，微生物学家将最终使全基因组测序成为分子分类学的工具。不过，在分类学基于全基因组测序比较以前，杂交在区分比较近的分类学关系上依然是有用的。

核糖体分型

核糖体分型（ribotyping）是一项用于细菌鉴定的技术，它利用一些前面讨论的基于 rRNA 的系统发育特征的方法（见 11.6 节）。然而，与比对测序方法不同，核糖体分型不用测序。相反，它衡量的是一个独特的图谱，这个图谱是这样产生的：把一种生物的 DNA 用限制酶消化后并把片段分离开，然后用 rRNA 探针探查（图 11.23a）。

因为两种生物核糖体 RNA 序列的差异转化为特异性限制酶切位点的存在（见 7.7 节关于限制酶的讨论），所以对一个独特的细菌种类来说其限制图谱是独一无二的（图 11.23a）。实际上，核糖体分型是如此精确以至于有一个绰号叫“分子指纹”，因为一系列独特的条带实际上是代表任何一种生物。

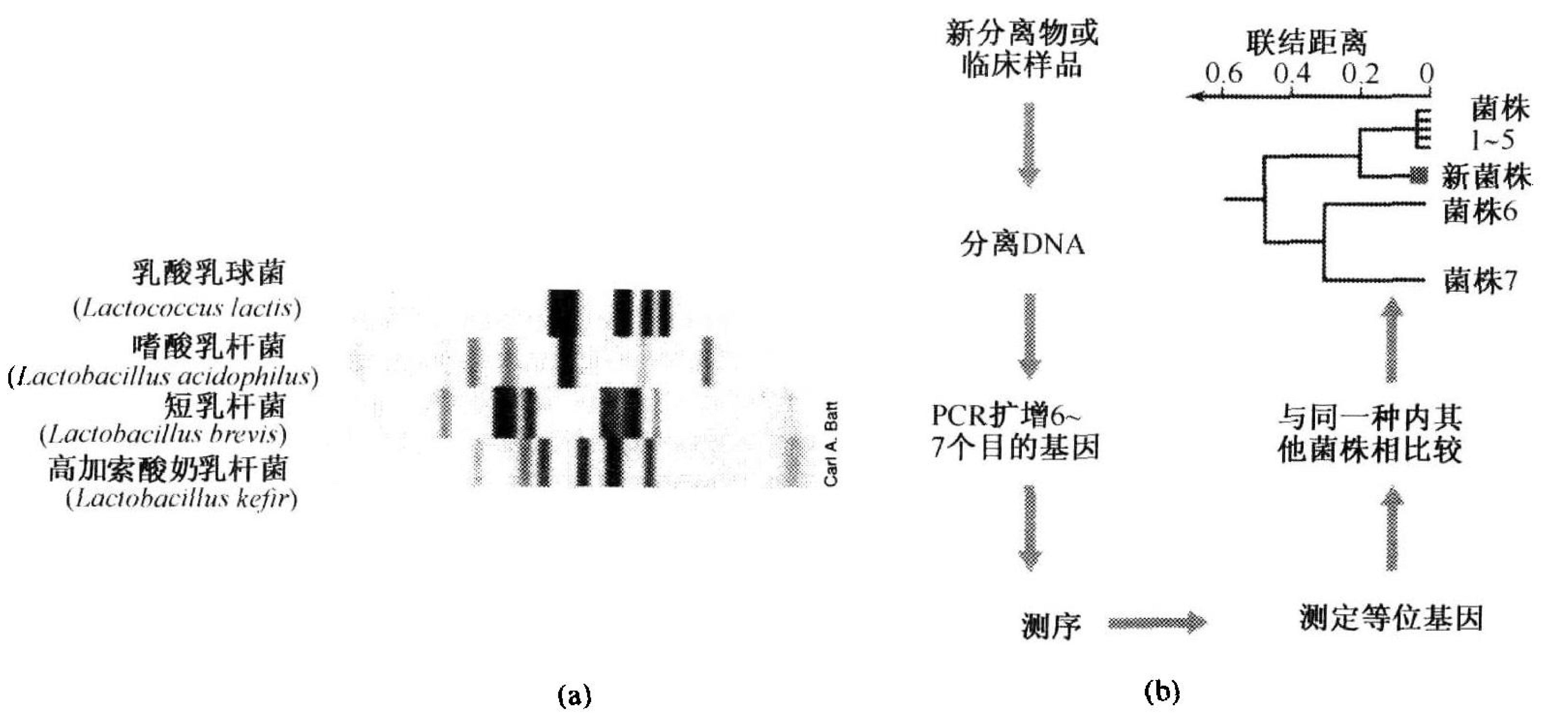


图 11.23　核糖体分型和多位点序列分型。（a）4 株不同乳酸菌核糖体分型结果。这个 DNA 片段的图谱是由每一细菌菌落的 DNA 经限制酶消化后产生的，然后用特异于一个独特的种甚至是种内菌株的 16S rRNA 基因探针探查。凝胶上由已知生物产生的图谱保藏在一个在鉴定环境或者临床分离物时用于比较的数据库里。条带亮度和位置的变化在鉴定中是重要的。（b）多位点序列分型（MLST）的步骤。

实践中，核糖体分型始于来自菌落或者液体培养物的 DNA。用 PCR 扩增编码 16S rRNA 及相关分子的基因，用一种或者多种限制酶处理，电泳分离酶切产生的片段，然后用探针探查（第 7 章关于这些方法的讨论）。然后将凝胶上的 DNA 片段产生的图谱数字化，用计算机把这个图谱与数据库中可以利用的其他涉及的生物图谱进行比较（图 11.23a）。核糖体分型是一个既快速（因为它绕过了实际的测序、序列排列及核糖体测序分析所需要的方法）又特异的细菌鉴定方法。由于上述原因，核糖体分型广泛应用于临床诊断及食物、水和饮料的微生物分析。

多位点序列分型

rRNA 测序和核糖体分型的一个共同局限是，这些分析仅集中在一个单独的基因上。多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）解决了这个问题，而且对于表现某一物种内菌株的特征来说是一个有力的工具。

MLST 包括对某一生物六七个“持家基因”片段进行测序，并且把它们与来自同一种生物的不同菌株的这些相同的基因集合进行比对。细胞中持家基因编码基本功能，并且持家基因位于染色体上而不是质粒上（见 7.4 节）。对于每一个基因，用 PCR 扩增其序列上大约 450bp 并测序。然后比对序列的数据在一个系统树图上表示出来（图 11.23b）。

在 MLST 中，对一个给定基因来说，拥有相同序列的菌株被认为在该基因上拥有相同的等位基因（allele），并且给该基因分配相同的数字。一个给定的基因可能有很多不同的等位基因，而且在同一个种的菌株群体中，通常存在 10～30 个等位基因。最终每一个菌株以一系列的数字（它的多位点序列类型）表示该菌株的特征。然后每一个序列类型之间的关系在一个联结距离的系统树图上表示出来，这些距离从 0（菌株完全相同）变化到 1（菌株仅仅有很远的关系）（图 11.23b）。

MLST 甚至在区分关系很近的菌株时都具有足够的分辨能力。因此对于区分低于种的水平的生物，它是一个比 rRNA 测序更好的工具。通过分析 7 个基因（每个基因分析 20 个等位基因），能计算出几十亿个可以被 MLST 分辨的不同的基因型。相比之下，对于在种的水平之上比对生物 MLST 就没有用了，因为它的分辨能力太灵敏而不能产生一个有意义的更高顺序的分类系统树。

迄今为止，MLST 已经从根本上影响了临床微生物学中对特殊病原菌株的区分。当在一个种内考虑时，这是一件很严肃的事情，例如，大肠杆菌，它的一些菌株如 K-12 可能是无害的，然而其他的菌株如 O157：H7 却能导致严重的甚至是致命的感染（见 29.8 节）。MLST 在流行病学研究上也相当有用。例如，MLST 能追踪一个在人群中移动的带病毒的病原细菌株，并且能毫不含糊的鉴定这个菌株，即使在人群中也存在许多与其关系很近的菌株。另外，因为这项技术是基于 PCR 的，MLST 能用于测试临床样品而不用首先将其在实验室培养分离出来。也就是说，如果一个特异的病原菌株的 DNA 能够从一个临床样品中获得，MLST 分析就能进行。

MLST 分析在细菌中已经展示出许多有趣的遗传图谱。例如，一些原核生物本来是无性生殖的，显然其 MLST 有很小的多样性。如对金黄色葡萄球菌中的菌株来说这是很典型的。其他的生物，如脑膜炎奈瑟氏球菌，仅有很弱的无性生殖，通过 MLST

分析就显示出巨大的多样性。这些结果表明，无论是什么原因，过去像脑膜炎奈瑟氏球菌这样的生物比金黄色葡萄球菌这样的生物经历了更多的水平基因流动。这些差异毋庸置疑地反映了这些生物环境适应上的差异及使它们竞争获胜的因素。这些信息对于药物开发策略及基于特殊病原菌的遗传稳定性或不稳定性的疫苗也许有用。

脂肪酸分析：FAME

另一个流行的细菌分类方法是通过分析存在于细胞质膜和外膜（革兰氏阴性菌，见4.9节）脂类的类型和比例的特征。这项技术因为脂肪酸甲酯（fatty acid methyl ester，FAME），而且当病原菌或者其他有害细菌的鉴定需要在常规基础上进行时，FAME广泛用于临床、公共卫生和食物及水的检验。

原核生物脂肪酸的组成高度可变，包括脂肪酸链长度的差异，是否存在双键、环、支链，或者羟基基团（图11.24a）。因此，脂肪酸图谱通常能鉴别一个特殊的细菌种类。为了实际的分析，脂肪酸在标准条件下生长的培养物的细胞水解产物中抽提出来，并被化学衍生以生成和它们相应的甲酯。现在这些挥发性的衍生物被气相色谱鉴定。然后将未知细菌脂肪酸的类型和含量的色谱图在数据库里进行比对，这个数据库含有上千种生长在相同条件下的涉及细菌的脂肪酸图谱。然后选择与未知的最匹配的一个（图11.24b）。

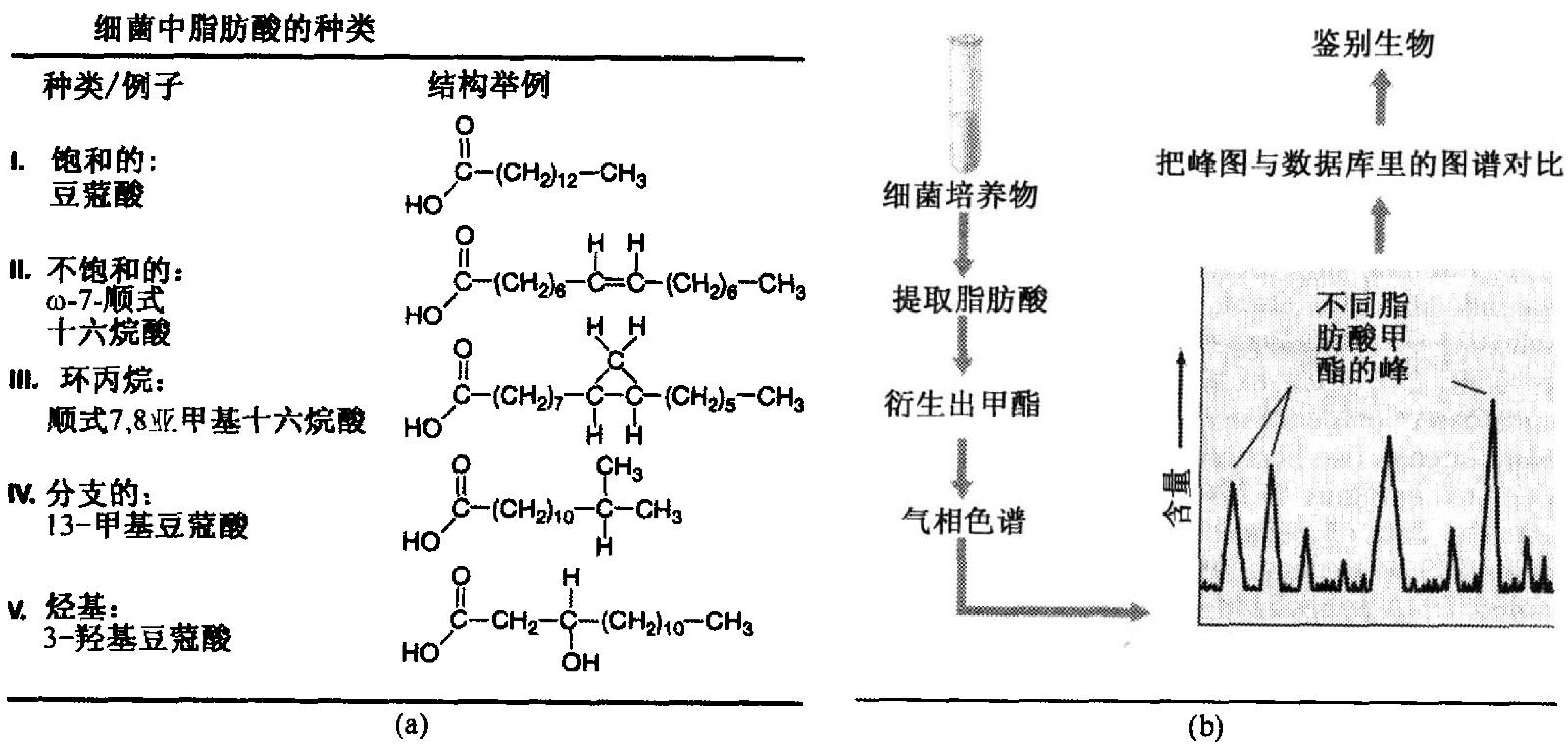


图11.24　细菌鉴定中的脂肪酸甲酯（FAME）分析。(a) 细菌中脂肪酸的种类。每一种仅给出一个例子，但是实际上已经在细菌中发现了200多种脂肪酸。一个甲酯含有一个取代了脂肪酸羧基上一个质子的甲基。(b) 程序。气相色谱中的每一个峰是一个特殊的脂肪酸甲酯，而且峰的高度与其含量成比例。

作为化学分类的工具，FAME有一些不足之处。特别是FAME需要严格的标准，因为一种生物的脂肪酸图谱是一个随温度、生长阶段（指数期与稳定期相对）及较小程度上的培养基变化的函数。因此，为了得到一致的结果，使未知生物在特殊的培养基及温度下生长是至关重要的，这样做是为了把它的脂肪酸图谱与数据库中在相同条件下的生物的图谱相比较。当然，对于很多生物来说这是不可能的，因此FAME分析就局限于那些可以在特殊条件下培养的生物。

概念检查

分子分类学包括对特殊细胞组分的分子分析。这些分析包括：DNA∶DNA 杂交、核糖体分型、多位点序列分型和脂肪酸分析。

- ◆ 两种生物的 DNA 杂交程度小于 10%表明它们______。
- ◆ 核糖体分型是如何区别于 16S 核糖体 RNA 基因测序的？如何区别于 MLST 呢？
- ◆ 什么是 FAME 分析？

11.12 微生物学中种的概念

在植物和动物界，种（species）是作为这样一个群体定义的：①该群体能自然地异种交配并产生可育后代；②该群体与其他种生殖隔离。然而，这个定义对原核生物来说并不成立。原核生物是单倍体而且进行无性生殖。像“产生可育后代”这样的概念毫无意义。不过，微生物学家通常提到细菌的“种”会规矩地给出新分离细菌的属名和种名。

那么什么是细菌的种呢？微生物学家用 SSU rRNA 测序，基因组杂交及 11.11 节中讨论的表型特征来辨别原核生物的种。

细菌种和高级分类

现在认为，如果一个原核生物的 16S rRNA 序列有 3%与其他生物有所不同（也就是说，其序列与数据库中其他序列有 97%相同），则被认为是一个新种。这不是一个任意的数字。支持这个提议基于下面的发现：两个 16S rRNA 序列 97%相同的原核生物，杂交度为 70%被认为是两个生物是同一个种（见 11.11 节和图 11.22）。这在图 11.25 中有描述。

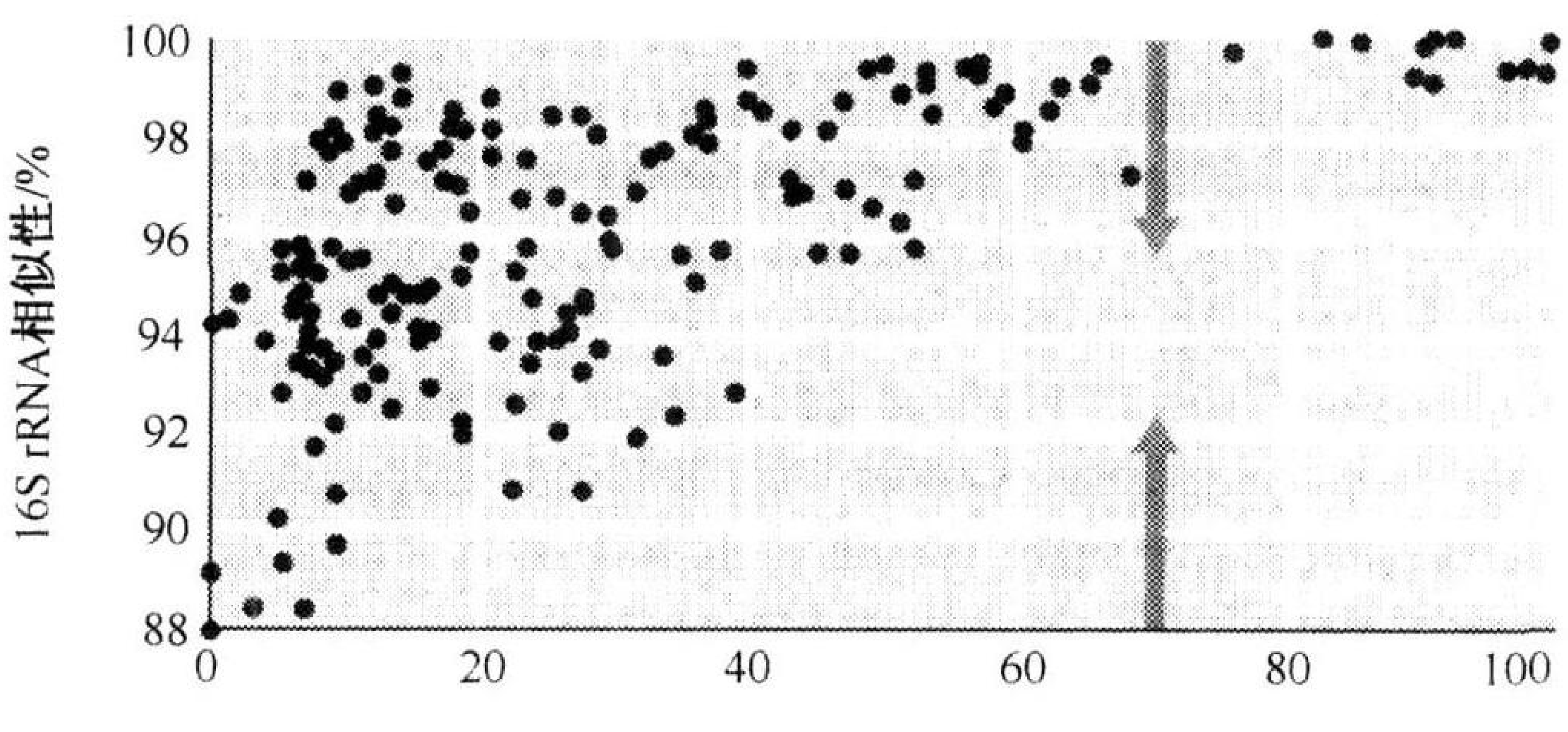


图 11.25 16S rRNA 序列相似性和基因组 DNA 之间的关系。不同生物之间的 DNA 杂交的数据来自于细菌域不同种的几个独立实验。橙色盒子中的点代表 16S rRNA 序列相似性和基因组杂交程度都很高的联结处。因此，各种情况下，被测的两种生物明显是相同的种。绿色盒子中的点代表被测的不同种的联结处，并且两种方法都这样显示。蓝色盒子显示了这样的生物的例子：基因组杂交表明，它们属于不同的种而 16S 测序却显示它们是同一个种。注意，上述 70%的 DNA 杂交，没有发现低于 97%的 16S 相似性。

图 11.25 的数据显示，在一些情况下 16S 测序在种的水平上区分生物时缺少基因组 DNA 杂交的辨别能力。尽管一种生物的 16S 序列与其他所有生物的 16S 序列有>3%的不同就证明它可能是一个新种，DNA 杂交的标准也证明了这一点，但是一些具有非常相似（甚至完全相同）的 rRNA 序列的生物，其基因组却十分不相关（图 11.25）。因此，万一 SSU 测序显示>97%的序列同源性，此时对于鉴定一个新物种基因组，杂交就是一个重要的分类学工具。

一个新种通常用一些菌株的特征来定义。种的概念在微生物学中是重要的，因为它将一些具有相同特征的菌株集合在一起。种归入属（genus，复数是 genera）。分子标准上组成一个属的不仅是对种的判断，序列与其他生物有>5%的差异（相应的有<95%的同源性）已经能使该生物组成一个新属。属归入科（family），科归入目（order），目归入纲（class），这样一直到最高分类水平——域（domain）（表 11.4 和表 11.5）。到 2004 年为止，已经正式确认了差不多 65 010 种细菌和古生菌（表 11.5）。

表 11.5 紫色硫细菌沃氏着色菌的分类等

分类单位	名称	特征	确认方法
域	细菌	原核细胞；具有典型的 rRNA 序列显微术	16Sr RNA 测序；独特生物标记，如肽聚糖
门	变形菌门	典型的变形菌门 rRNA 序列	16S rRNA 测序
纲	γ-变形菌纲	革兰氏阴性菌；典型的变形菌纲 rRNA	革兰氏染色，显微术
目	有色菌目	光养紫色细菌	色素特征测定（图 17.3）
科	有色菌科	紫色硫细菌	能氧化 H_2S 并在细胞内储存 S^0；显微观察培养物可见 S^0 的存在（见照片）
属	着色菌属	杆状紫色硫细菌	显微术（见照片）
种	沃氏着色菌	细胞(3.5～4.0)μm×(5～11)μm；主要在细胞两端储存硫（见照片）	用测微尺在显微镜下测量细胞大小；在细胞中寻找含 S^0 小球的位置（见照片）



沃氏着色菌（*Allochromatium warmingii*）细胞的照片

在一个新分离生物的鉴定和命名中，该生物必须要满足它的种名称以上所有分类等级的标准。因此，在表 11.4 给出的例子显示了光养细菌沃氏着色菌的分类学层次，所有着色菌属的种必须是杆状、革兰氏阴性紫色硫细菌；如果没有满足其中的一个标准，就不能认为这个生物是着色菌属的一个种。而且，着色菌属必须能满足定义着色菌科的所有标准，一直这样沿着分类学的阶梯向上走。换句话说，当顺着分类学等级水平从域

下降到种时，用于区分两个生物的标准变得不那么普遍而是更加特异（表 11.4）。

细菌的物种形成

一个新的细菌种是怎么出现的？目前这是微生物学家争论的热点。不过，已经提出了细菌物种形成的模型，这里我们讨论一个流行的模型。设想一个细胞群体是由一个单独的细胞发育而来，而且占有一个独特的生态位。如果这个群体里的细胞享有独特的资源（如一种关键的营养），这个细胞群体可以称作一个生态型。不同的生态型可以生活在同一个环境里，但是每一个在它自己的小生境里能自由生存才是成功的。

DNA 复制错误（突变）以低的但常规的频率发生（见 10.3 节）。在一个给定的生态型里，突变的发生使其增加了对环境的适应（适应性突变），引起周期性选择。当这些发生的时候，旧的生态型被新生态型的群体清除（图 11.26）。这样，从遗传学意义上来说最终细胞群体“离开”了彼此。重复一轮又一轮的突变和选择，最终导致一个生态型，该生态型在遗传上彻底地与原始的生态型不同，被认为是一个新种（图 11.26）。注意，一个生态型里一系列的事件对其他的生态型毫无影响，因为不同的生态型并不竞争同一种资源（图 11.26）。

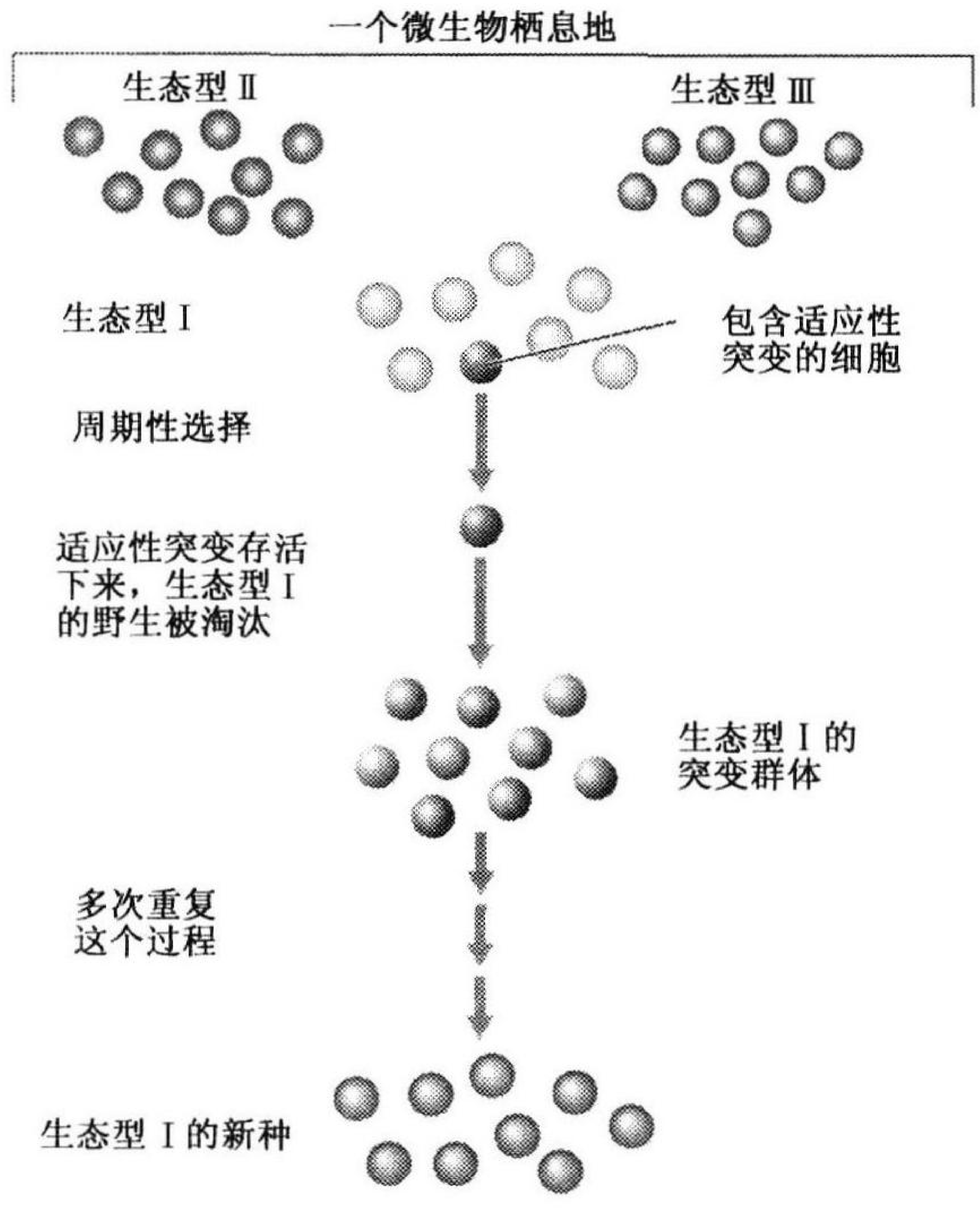


图 11.26　细菌物种形成的模型。在一个单独的微生物栖息地几个生态型可以共存，各自占据其根本的生态位。如果一个生态型里发生了有益的突变，含有那个突变的细胞最终会形成一个群体，将会取代最初的生态型。当一个给定的生态型里重复发生这样的过程时，会产生一个遗传上截然不同的细胞群体，它代表一个新的种。因为其他的生态型不与它们竞争相同的资源，它们不被其生态型或栖息地之外的遗传和选择事件所影响。

图 11.26 显示的物种形成的模型仅仅基于垂直（母亲到女儿）基因流动这一假设。

然而，我们知道细菌物种的形成在一定程度上也受侧向（水平）基因转移 [lateral (horizontal) gene transfer] 的影响。水平流动是种间基因通过接合、转导和转化而进行的转移（第 10 章）。原核生物是两性混杂的而且沿着很宽的系统发生路线交换基因。因此，生态型中新的遗传能力可能从其他生态型的细胞的基因产生而不是通过突变和选择。

原核生物中水平基因流动的程度是不定的。基因组测序已经显示了这样的例子：有些水平流动显然很频繁而另外一些则很稀疏（见 15.8 节）。另外，多位点序列分型（见 11.11 节）显示出某些种内的遗传交换分布广泛，然而在其他种内实际上是不存在的。尽管受水平基因流动影响，但是人们认为，物种形成最初是突变和周期选择而不是水平转移驱动的结果（图 11.26）。这是因为由水平转移获得的基因通常数量很少，仅赋予细胞临时性的特征，而且如果选择压力使它们减少的话它们经常会丢失这些获得的基因。

有多少种原核种类?

细菌进化将近 40 亿年的结果是（见图 11.8 和 11.10 节）我们现在所看到的原核界。微生物分类学承认：目前还不能给原核生物种类的数目一个严格的评估。不过，他们也承认在最后的分析中这个数字将会非常大。已经知道几千种原核种类（表 11.6），并且怀疑存在多于几千种原核生物，可能总共有 100 000～1 000 000 种（或者一些评估认为是这个的 10 倍）。任何人计算，原核生物种类最后的数目都可能是巨大的。

微生物群落分析（见 11.7 节和 18.5 节）表明，以我们的能力实际上仅仅挖掘出原核生物培养多样性的表面。为了揭示原核生物多样性而应用更加严格的工具（分子的和培养的），目前已经预测的原核生物种类的巨大数目可能都是低估的，也许低估了几倍。目前的现实是，对原核生物物种形成的正确估计完全超出了现有技术的研究能力。但是当把其他的东西用于微生物学时，这将会发生改变。显然，很多令人兴奋的工作留给了对原核生物多样性感兴趣的人。

表 11.6　分类等级及已知的原核生物种类的数目

等级	细菌	古生菌	共计
域	1	1	2
门	25	4[a]	29
纲	34	9	43
目	78	13	91
科	230	23	243
属	1227	79	1306
种	6740	289	7029

a. 数字表示到 2005 年为止有效命名的细菌和古生菌的属和种。古生菌门的分类包括古生古生菌和纳古菌，是还没有正式认可的门。

资料：Garrity G M，Libum T G，Bell J A. 2005. 伯杰氏系统细菌学手册，第二版，第二卷，A 部分，159～220 页．斯普林格出版社，纽约。

概念检查

种的概念应用于原核生物和真核生物，而且它们存在一个相似分类等级，以域作为最高水平的分类单元。细菌的物种形成可能发生于一个生态型中对一个有利特征的重复周期性选择和水平基因流动的结合。

◆ 一个给定的属包括几个______，一个______包括几个属。

◆ 生态型是什么？

◆ 目前已了解的原核生物有多少种类？可能存在多少种？

11.13 命名和伯杰氏手册

随着双名法（binomial system）的应用贯穿生物学，原核生物都给出了属名和种名。所用的术语都是拉丁文或者描述适合于生物特征的拉丁化的希腊语印刷成斜体字。例如，已经描述了超过 100 种的芽孢杆菌属（*Bacillus*）生物，包括枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、蜡状芽孢杆菌（*B. cereus*）和巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）。这些种名的意思分别是“苗条的”、“蜡的”和“大兽”，而且提到了每种生物的形态、生理或生态学的显著特征。

原核生物（细菌和古生菌）的命名遵守细菌学法规——细菌命名的国际法规。这个法典提出了一个正式的框架，根据这个框架原核生物被正式命名；而且通过这个程序已经存在的名字也能发生改变，例如，当新的数据使分类学有正当理由重新整理的时候。甚至有拒绝一个名字的规则，如在最初的命名过程中出现错误或者一个名字已经无效了。这个法典覆盖了对所有原核生物的种、属、科和目命名的规则。

菌种保藏和新分类的发表

如果一个新的生物被分离而且认为它很独特，至于它是否完全与其他种类不同而被描述为一个特异的种必须要做出一个判断，或者它甚至完全与已经描述的属不同而被作为一个新属描述（这种情况下自动产生了一个种）。作为一个新属或种要达到正式的分类学标准，要对分离物有一个详细的描述而且发表被提议的名字，并且这种生物的可传代培养物存放在两个国际培养物保藏机构里。国际培养物保藏机构包括美国典型微生物菌种保藏中心（ATCC，马纳萨斯，弗吉尼亚，美国）或者德国微生物菌种保藏中心（DSMZ，德国微生物保藏，不伦瑞克，德国）（见 30.1 节）。保藏的菌株为新种类的模式菌株和标准，其他认为与之相同的菌株可以与其比较。

保藏存放的菌种，通常在很低的温度（－80～－196℃）下冷藏，或者冷冻干燥。这个惯例与植物或动物的分类学方法不同。这些保存的（死的）样品（干燥的植物标本材料或者化学固定的动物样品）作为新提出种的比对标准。相对而言，微生物学家常常依赖于一个活的典型菌株，这个菌株可以在不同的实验室里长成典型的菌落，而且能被研究和比较。这种方法涉及对生物特征更加详细和可重复的比较，尤其是在分子水平上。

如果对一种新生物的描述发表在一个杂志上，而不是在《系统与进化微生物学国际期刊》（*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *IJSEM*）——该杂志是原核生物分类和鉴定的正式出版记录，那么在正式接受它作为原核生物新的分类单元之前，必须将已出版论文的复印件递交给这个杂志，使该命名生效。每一期 *IJSEM* 都发行经核准的新提出的名称，并且作为原核生物分类学研究中的出版记录。用来搜索新的和正式原核生物名称的网站为：www. bacterio. cict. fr。

伯杰氏手册和原核生物

通过使新提出的名称生效，*IJSEM* 铺就了它们通往《伯杰氏系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）之路，这是对原核生物的一个重要的分类学处理（图 11.27）。《伯杰氏系统细菌学手册》（简称《伯杰氏手册》），由自 1923 年以来的微生物学家学会组织编写，是认可的原核生物种类信息的纲要。每一章由一个专家写，包括表、图及其他的对于鉴定目的有用的系统信息。《伯杰氏手册》第二版第一卷 2001 年出版，第二卷 2005 年出版，另外的 3 卷在 2007 年左右出版。《伯杰氏手册》第二版包括很多概念，这些概念源于 rRNA 测序和基因组研究及大量表型信息的结合。

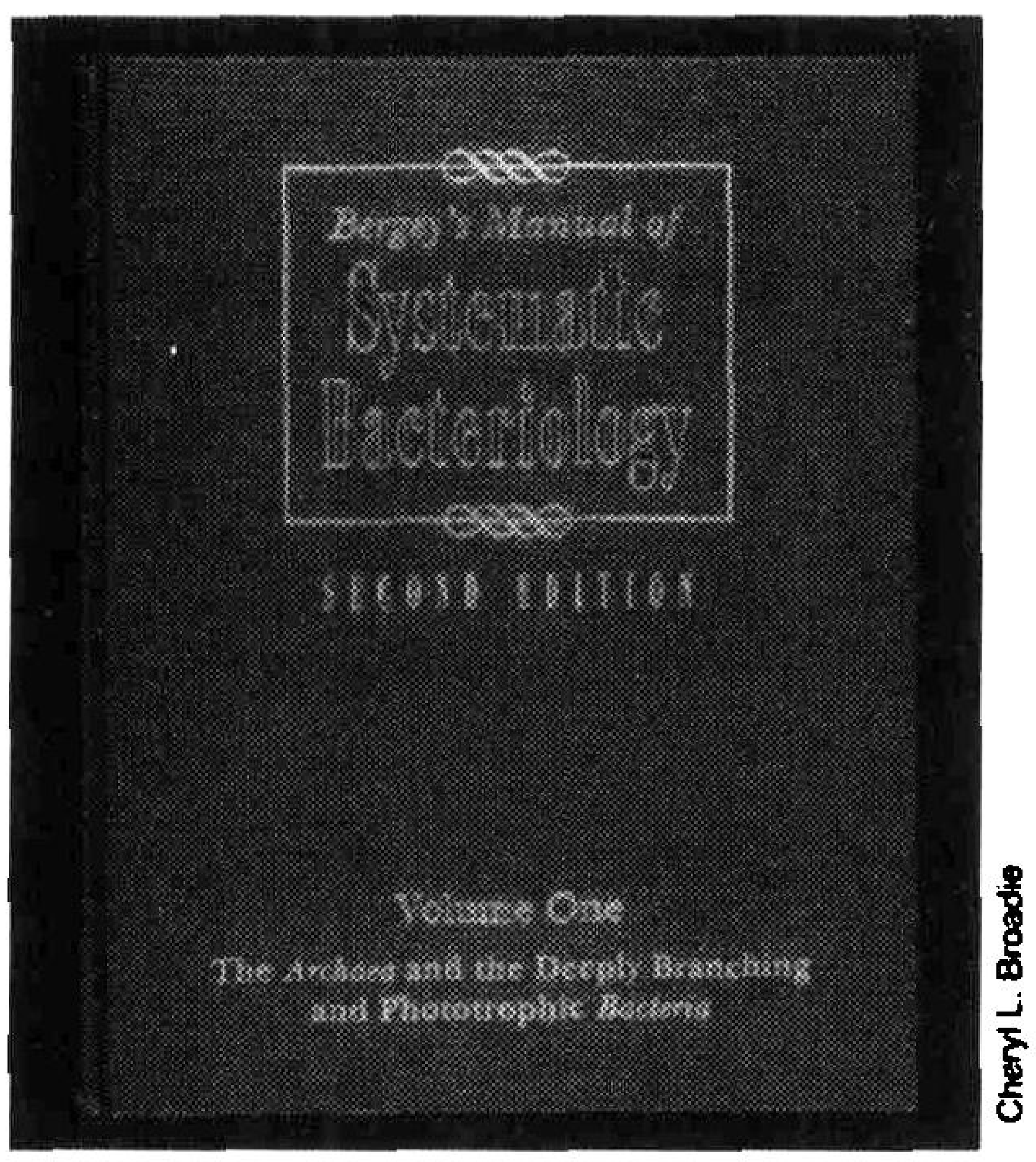


图 11.27　《伯杰氏系统细菌学手册》第二版。该手册有 5 卷，描述了所有已知原核生物（细菌和古生菌）主要的特征。

原核生物多样性中第二个重要的参考文献是《原核生物》。这部作品的第二版（1992）超过了 4100 页（四卷），现在第三版已经可以在线使用（http：//141.150.157.117：8080/prokPUB/index. htm）。电子版包括频繁的修正，反映了出现在原核生物分类学和系统发生学上的新数据的快速节奏。

《伯杰氏手册》和《原核生物》共同地为微生物学家提供原核生物分类学和系统发生学的基础和详细内容，正如我们今天所知道的那样，它对于微生物学家描述新分离原核生物的特征来说是代表性的“关键”资源。

正如我们将会在第 18 章看到的那样，实际上有很多原核生物迄今没有在实验室培养出来。可能没有“不可培养的”原核生物，但是目前仅仅是由于我们对于它们知道得太少而无法培养。然而，当这些生物最终被培养、描述特征并命名时，《伯杰氏手册》和《原核生物》将会极大地扩展以容纳数目可观的原核生物种类。

概念检查

原核生物都被给予描述性的属名和种名。正式认可一个新的原核生物种类需要把这种生物的样品保存在一个菌种保藏中心，正式出版这种新生物的种名及特征描述。系统

细菌学的伯杰氏手册是细菌和古生菌主要的分类学依据。

- ◆ *IJSEM* 是什么？它实现什么分类学功能？
- ◆ 为什么在分类学中活的细胞材料可能比保存的样品更有用？

复习题

1. 地球多大年龄了？知道的最早的微生物化石有多大年龄了？（见 11.1 节）
2. 原始生物为了进行自我复制，它们必须具备哪些主要特征？为什么？（见 11.2 节）
3. RNA 的哪些特征创造了一个可能的 RNA 生命时代？如果曾经存在 RNA 生命形式，现在可能存在它们的哪些痕迹？（见 12.2 节）
4. 讨论铁、FeS 和 H_2 在早期生命进程中可能起的作用。（见 11.3 节）
5. 为什么蓝细菌的出现对地球生命的进一步进化起重要的作用？地质记录的哪些组分被用来注明蓝细菌进化的历史？（见 11.3 节）
6. 什么证据表明现代包含细胞器的真核细胞有赖于内共生作用？（见 11.4 节）（提示：你可以复习 14.2～14.5 节）
7. 为什么 rRNA 在系统发育研究中是比蛋白质（如细胞色素）好的分子？（见 11.5 节）（提示：思考一下这些大分子在原核生物中的贡献）
8. 描述获得 16S rRNA 序列的方法。聚合酶链反应在分子系统发育学中起什么作用？（见 11.6 节）
9. 什么是特征序列？它有何系统发育价值？怎样鉴别特征序列？（见 11.7 节）
10. FISH 技术是什么？举例说明怎么应用。（见 11.7 节）
11. 在 rRNA 序列研究中有哪些主要的进化发现？这些发现如何修正经典的进化观点？这些观点如何支持现代真核生物起源的论断？（见 11.8 节）
12. 古生菌和真核生物共同拥有哪些主要的生理学和生物化学特征？古生菌和细菌呢？（见 11.9 节）
13. 在传统的细菌分类学中，有哪些用于归类微生物的主要类型特征？如果有不止一个特征，这些特征中哪一个具有系统发育的预测价值？（见 11.10 节）
14. 为什么 GC 碱基比对于系统发育检测无用？何种情况下 GC 碱基比在分类学研究中有用？（见 11.10 节）
15. 作为分类工具核糖体分型是如何区别于 16S rRNA 测序的？核糖体分型是如何区别于多位点序列分型的？（见 11.11 节）
16. FAME 分析衡量的是什么？（见 11.11 节）
17. 怎样才能确认产生了新的细菌种类？有多少细菌种类？为什么我们不能更精确这个数目？（见 11.12 节）
18. 观察下面的细菌名称：铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。该名称哪部分是种名？和另一个名字同水平的分类单元是什么？参照分类等级，上述双名中的哪个名字之后有可能列出几个其他的名称？（见 11.13 节）

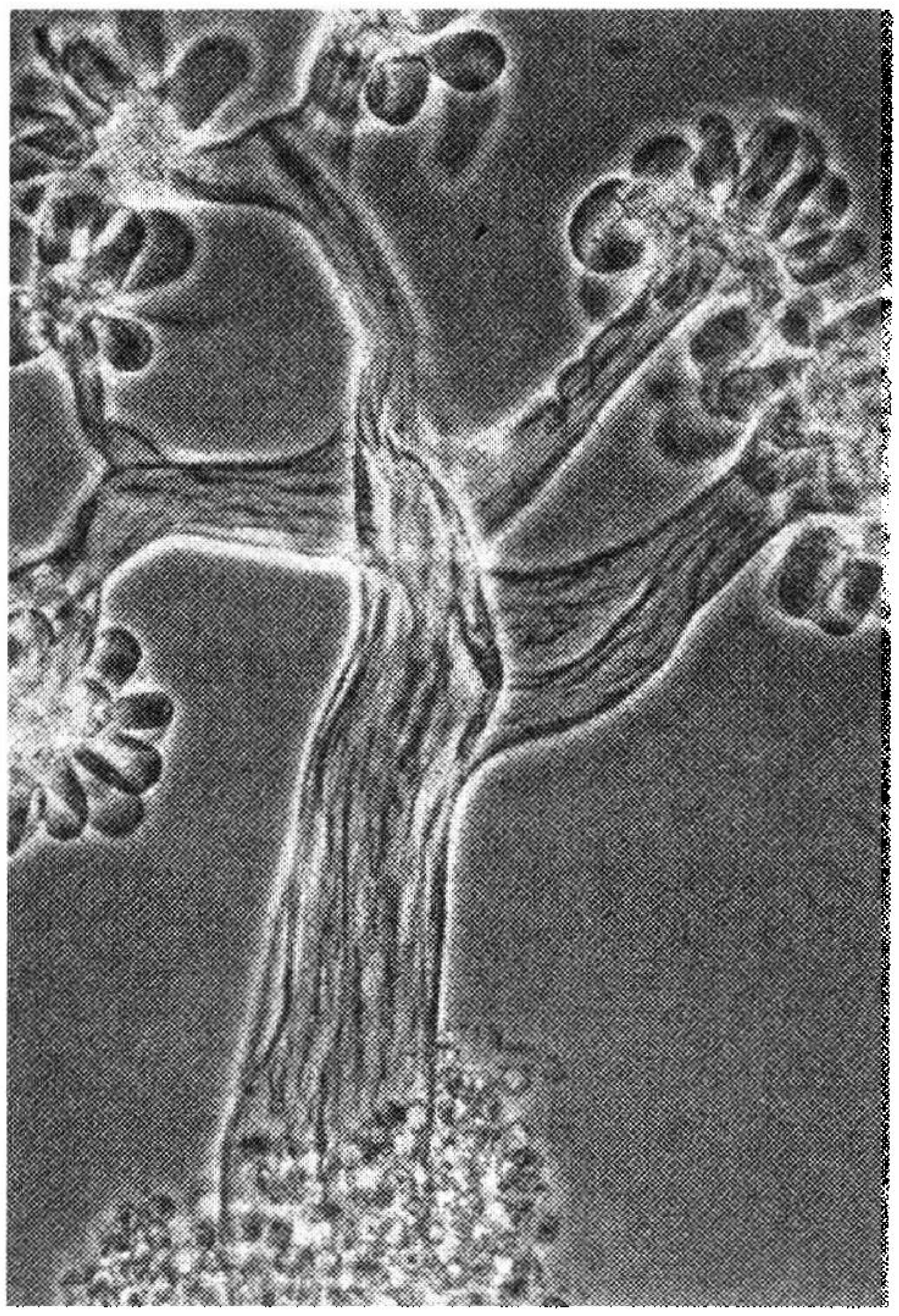
应用题

1. 比较生命最初产生时和现在地球自然和化学环境的不同。从生理学的观点看，论述为什么动物不可能在早期地球上存在，至少两个理由。
2. 为何现代生命的产生同数十亿年前生命的产生十分不同？
3. 假设某人反对内共生理论，而你要反驳他，列出 5 种证据以支持你的观点，即确实发生过内共生现象。(写下答案之前可以先复习 14.4 节)
4. 根据下述序列计算这 3 个生物间的进化距离，并预测哪 2 个生物的关系更密切。画出系统发育树以说明这 3 个生物大致的进化关系。
   生物 1：AGGUACGUUA
   生物 2：UGCCACGGUU
   生物 3：AGGUACGGUA
5. 假设你在沿着图 11.24 的线路做两个原核生物的脂类分析。培养物 A 显示丰富的短链非饱和脂肪酸；培养物 B 的细胞分析显示存在醚键连接的植烷脂类。根据这些信息，生物 A 和 B 属于哪个系统发生域？同样地，如果告诉你这两个生物都是嗜极生物（见 2.4 节），并且一个来自沸腾的温泉而另一个来自极地的海冰，它们各是哪一个？最后，根据你的脂类分析结果及大部分脂类在细胞的哪个位置的知识（见 3.4 节和图 3.3），描述你所检测的物质是如何有利于每一个生物在其极端环境下茁壮成长的。(回答之前你可以复习 6.10～6.12 节)
6. 测定下述 DNA 的 GC 碱基比：
   TAAGCCTGCAAGCTTAGCTA
   ATTCGGACGTTCGAATCGAT
7. 你能查阅到关于原核生物分类学和系统发生学信息的哪些参考资料？关于富集、分离和培养的呢？如果你的图书馆有这些资料，比较它们的目录。哪些最着重强调分类和命名？

（宋存江　译，魏东胜　校）

12

原核生物多样性：细菌



细菌的种群依据它们的外形、生理学和系统发育特点显示出极大的多样性。这里展示的是一种产子实体的黏细菌——藏红花软骨霉状菌（*Chondromyces crocatus*），含有在一个完整生活周期中产生的黏孢子。黏孢子能发育和形成一个新的细胞种群。

词汇表

抗酸性 (acid-fastness)：分枝杆菌的一种特性，当细胞用碱性品红染色后，再用酸性乙醇不能使其褪色

羧酶体 (carboxysome)：多面体细胞内含物，含有晶体蛋白质——核酮糖二磷酸羧化酶 (RubisCO)，而 RubisCO 是卡尔文循环的关键酶

化能无机营养生物 (chemolithotroph)：能够氧化无机物（如 H_2、Fe^{2+}、S^0 或 NH_4^+）从而获得能量的微生物

绿色体（chlorosome）：存在于绿细菌和绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）中的雪茄状结构，外面由非单位膜包被，内含可捕光的菌绿素（c、d 或 e）

聚生体（consortium）：两层或多层膜的原核生物，通常生活在密集的共生环境中

蓝细菌（cyanobacteria）：产氧光养原核生物，含有叶绿素 a 和藻青素，但不含有叶绿素 b

肠细菌（enteric bacteria）：一大类杆状的革兰氏阴性菌，其特点为兼性有氧代谢

绿硫细菌（green sulfur bacteria）：不产氧光养菌，含有叶绿体和类似叶绿素样能捕光的菌绿素 c、c_s、d 或 e

阳光细菌（heliobacteria）：不产氧光细菌，含有菌绿素 *g*

异形胞（heterocyst）：一种分化型蓝细菌细胞，可以固定氮，但不能进行产氧光合作用

异型发酵（heterofermentative）：与乳酸菌有关，能够产生多种发酵产物

同型发酵（homofermentative）：与乳酸菌有关，发酵产物仅乳酸一种

超嗜热菌（hyperthermophile）：最适生长温度在 80℃以上的微生物

甲烷营养菌（methanotroph）：一种能氧化甲烷的生物，在能量代谢中把甲烷作为其电子供体

甲基营养菌（methylotroph）：一种能够氧化不含 C—C 键有机物的菌，如果氧化的是甲烷，则称为甲烷营养菌

兼养微生物（mixotroph）：一种能通过氧化无机物获得能量，但是需要有机物作为碳源的菌

硝化细菌（nitrifying bacteria）：化能无机营养型，能够将 NH_3^+ 变成 NO_2^-，或将 NO_2^- 转变成 NO_3^-

原绿菌（prochlorophyte）：一种产氧光养原核生物，含有叶绿素 a 或 b，但缺乏藻青素

曰叶角状物（prosthecae）：细胞质外流形成的独立的附着物，外有细胞壁包被

变形细菌（proteobacteria）：一大类细菌，包括大量的革兰氏阴性杆菌和球菌

紫色非硫细菌（purple nonsulfur bacteria）：一类自养的原核生物，包含叶绿素 a 或 b，也能很好地进行光能异养生活，对 H_2S 的耐受性较低

紫色硫细菌（purple sulfur bacteria）：一类光养原核生物，含有菌绿素 a 或 b，其特性为可以氧化 H_2S 并在细胞内储存单质硫（在外硫红螺菌和盐红螺菌属中于细胞外储存）

螺旋体（spirochete）：一种细长的、高度卷曲的革兰氏阴性原核生物，其特征是具有可运动的轴丝

Stickland 反应（Stickland reaction）：一种氨基酸的发酵过程，反应中一个氨基酸充当电子供体，另一个氨基酸充当电子受体

硫酸盐还原菌（sulfate-reducing bacteria）：一大类不产氧细菌，可以 SO_4^{2-} 作为电子受体进行无氧呼吸，产生 H_2S

I　细菌的系统发育学

在第 11 章中，强调了细菌间的进化关系。在本章和接下来的第 13 章中将要讨论主要微生物群落的特点。本章主要是细菌，下两章分别讨论古生菌和微小的真菌。

我们不可能将已知近 7000 种的原核生物一一进行介绍，因此使用进化树来表示我们讨论的重点。我们将探究最为人熟悉的种类，特别是进化信息最为清楚的。对于原核生物多样性方面的详细信息，可参考《伯杰氏系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）和《原核生物》（*The Prokaryotes*）（见 11.13 节）。

12.1　细菌系统发育纵览

实验室研究结果表明，细菌进化中至少有 18 个主要分支，另外通过核糖体 RNA

测序鉴定了许多其他种，图 12.1 展示了细菌进化树。细菌发育最原始的一个门包括产液菌属（*Aquifex*）和相近的种，该属所有菌株都是超嗜热氢氧化能无机营养菌。其他早期的门如热脱硫杆菌属（*Thermodesulfobacterium*）、栖热袍菌属（*Thermotoga*）和非硫绿细菌（绿屈挠杆菌，*Chloroflexus*），也包括嗜热菌株。

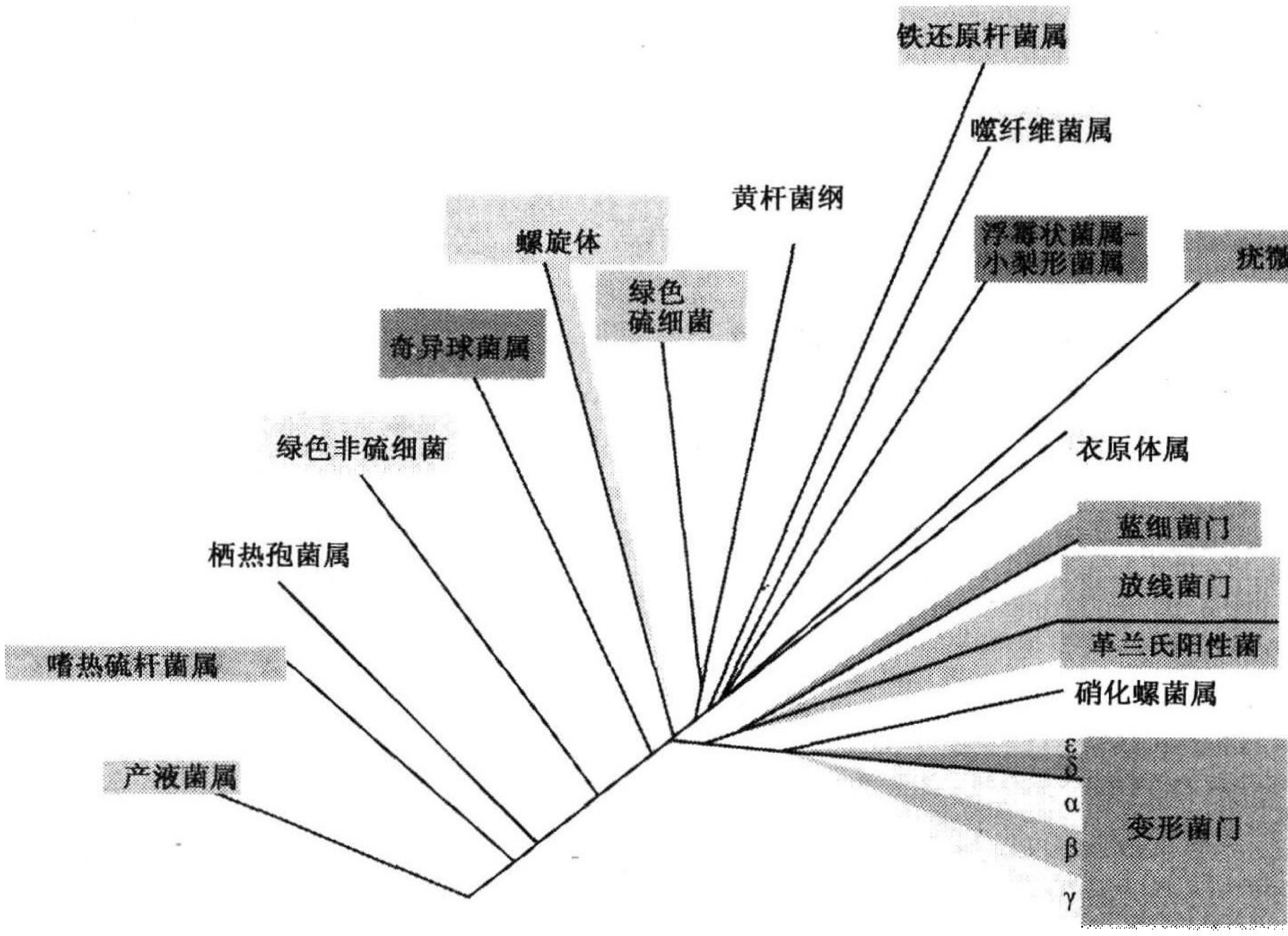


图 12.1 基于 16S rRNA 序列分析比较的关于主要细菌门的详细的进化树。包括的许多分支仅仅来自环境样品（见 11.7 节），事实上存在 40 个分支的细菌。

在绿色非硫细菌之后，是异常球菌属（*Deinococcus*）和相近菌株、形态独特的螺菌、光养的绿细菌、化能有机营养菌黄杆菌属（*Flavobacterium*）和噬纤维菌属（*Cytophaga*）、出芽生殖的浮霉状菌属、小梨形菌属（*Planctomyces-Pirella*）和疣微菌（*Verrucomicrobium*）、衣原体属（*Chlamydia*）、硝化螺菌属（*Nitrospira*）和铁还原杆菌（*Deferribacter*）（图 12.1）。每个属都将在本章讨论。

剩下的 3 个将是本章的主要内容，包括革兰氏阳性（G^+）细菌、蓝细菌和变形细菌。每一个门都是一大类，包括许多属和种，而且它们的表型已为人们所熟知。G^+ 细菌被分为两个亚群，称为低 GC 和高 GC 群［GC 指的是 DNA 中 GC 碱基的比例（见 11.10 节）］，分别低于或高于 50%。G^+ 细菌是一大类化能有机营养菌，在 12.19～12.24 节将被详细介绍。蓝细菌是产氧光自养型细菌，与 G^+ 细菌有相近的进化根源，这类生物将在 12.25 节和 12.26 节中讨论。

最后一个门是变形细菌（图 12.1），这是细菌中最大的类群（见 12.2～12.28 节）。变形细菌包括 5 个亚类：α、β、γ、δ、ε（表 12.1）。从生理上讲，变形细菌可能是光养型、化能无机营养型和化能有机营养型。事实上，在第 17 章中我们将见到这个菌群中产能方式的多样性。

表 12.1　变形细菌中代表属[a]

类群	属
α	醋杆菌属（*Acetobacter*）、农杆菌属（*Agrobacterium*）、产碱菌属（*Alcaligenes*）、固氮螺菌属（*Azospirillum*）、拜叶林克氏菌属（*Beijerinckia*）、慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、布鲁氏菌属（*Brucella*）、柄杆菌属（*Caulobacter*）、埃里希氏体属（*Ehrlichia*）、葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）、生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）、甲基孢囊菌属（*Methylocystis*）、硝化杆菌属（*Nitrobacter*）、副球菌属（*Paracoccus*）、红螺菌属（*Rhodospirillum*）、红假单胞菌属（*Rhodopseudomonas*）、红细菌属（*Rhodobacter*）、红微菌属（*Rhodomicrobium*）、小红卵菌属（*Rhodovulum*）、红球形菌属（*Rhodopila*）、根瘤菌属（*Rhizobium*）、立克次氏体属（*Rickettsia*）、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）、发酵单胞菌属（*Zymomonas*）
β	水螺菌属（*Aquaspirillum*）、博德特氏菌属（*Bordetella*）、伯克霍尔德氏菌属（*Burkholderia*）、色杆菌属（*Chromobacterium*）、脱氯单胞菌属（*Dechloromonas*）、嘉利翁氏菌属（*Gallionella*）、纤发菌属（*Leptothrix*）、嗜甲基菌属（*Methylophilus*）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）、亚硝化单胞菌属（*Nitrosomonas*）、草酸杆菌属（*Oxalobacter*）、极性单胞菌属（*Polaromonas*）、罗尔斯通氏菌属（*Ralstonia*）、红环菌属（*Rhodocyclus*）、红育菌属（*Rhodoferax*）、球衣菌属（*Sphaerotilus*）、螺菌属（*Spirillum*）、硫杆菌属（*Thiobacillus*）、动胶菌属（*Zoogloea*）
γ	醋杆菌属（*Acetobacter*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）、固氮菌属（*Azotobacter*）、着色菌属（*Chromatium*）、埃里希氏体属（*Ehrlichia*）、外硫红螺菌属（*Ectothiorhodospira*）、欧文氏菌属（*Erwinia*）、弗朗西斯氏菌属（*Francisella*）、盐单胞菌属（*Halomonas*）、盐红螺菌属（*Halorhodospira*）、盐硫杆菌属（*Halothiobacillus*）、军团菌属（*Legionella*）、发亮菌属（*Leucothrix*）、甲基单胞菌属（*Methylomonas*）、海洋螺菌属（*Oceanospirillum*）、发光杆菌属（*Photobacterium*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、甲基球菌属（*Methylococcus*）、甲基杆菌属（*Methylobacter*）、亚硝化球菌属（*Nitrosococcus*）、硝化球菌属（*Nitrococcus*）、嗜热着色菌属（*Thermochromatium*）、硫微螺菌属（*Thiomicrospira*）、硫螺菌属（*Thiospirillum*）和另一些紫硫细菌、沙门氏菌属（*Salmonella*）和其他肠细菌、弧菌属（*Vibrio*）、黄单胞菌属（*Xanthomonas*）
δ	不动杆菌（*Acinetobacter*）、气单胞菌属（*Aeromonas*）、蛭弧菌属（*Bdellovibrio*）、脱硫单胞菌属（*Desulfuromonas*）、脱硫弧菌（*Desulfovibrio*）和大多数其他硫酸盐还原菌、弗朗西斯氏菌属（*Francisella*）、地杆菌属（*Geobacter*）、盐单胞菌属（*Halomonas*）、莫拉氏菌属（*Moraxella*）、黏球菌属（*Myxococcus*）和其他黏细菌、暗杆菌属（*Pelobacter*）、互营杆菌属（*Syntrophobacter*）
ε	弯曲杆菌属（*Campylobacter*）、螺杆菌属（*Helicobacter*）、卵硫菌属（*Thiovulum*）、沃林氏菌属（*Wolinella*）

a. 这个表并不全面，只是列举了一些有详细描述的变形细菌的属。变形细菌属完整的列表及与其他属的关系见附录 2。

对各门进行了描述后，我们将从最大、代谢机制最复杂的变形细菌开始介绍。

Ⅱ 门 1：变形细菌

表 12.1 列举了变形细菌中一些重要的菌属。作为一个类群，这些菌株都是 G^-，有极为丰富的代谢多样性，是医药、工业和农业中所熟知的 G^-。下面开始讨论紫色光养细菌。

12.2 紫色光养细菌

代表属：着色菌属（*Chromatium*，也称红硫菌属）、外红硫菌属（*Ectothiorhodospira*）、红细菌属（*Rhodobacter*）、红螺菌属（*Rhodospirillum*）

紫色光养细菌进行不产生氧的光合作用。因此，它与蓝细菌不同（见 12.25 节），

没有 O_2的参与。紫色细菌形态多样，现已根据遗传型、表型和理化特征建立这类微生物的分类地位。不同的属分别属于 α、β、γ 变形细菌。

紫色细菌含有称为菌绿素（bacteriochlorophyll）的叶绿素或各种胡萝卜素（carotenoid pigment）（见 17.9 节和图 17.4）。这些色素使得紫色细菌有特定的颜色，通常是紫色、红色或者棕色（图 12.2）。在第 17 章中我们将讨论这些色素的结构和它们如何在光介导的能量产生中发生作用［这个过程称作光合磷酸化（photophosphorylation）］。

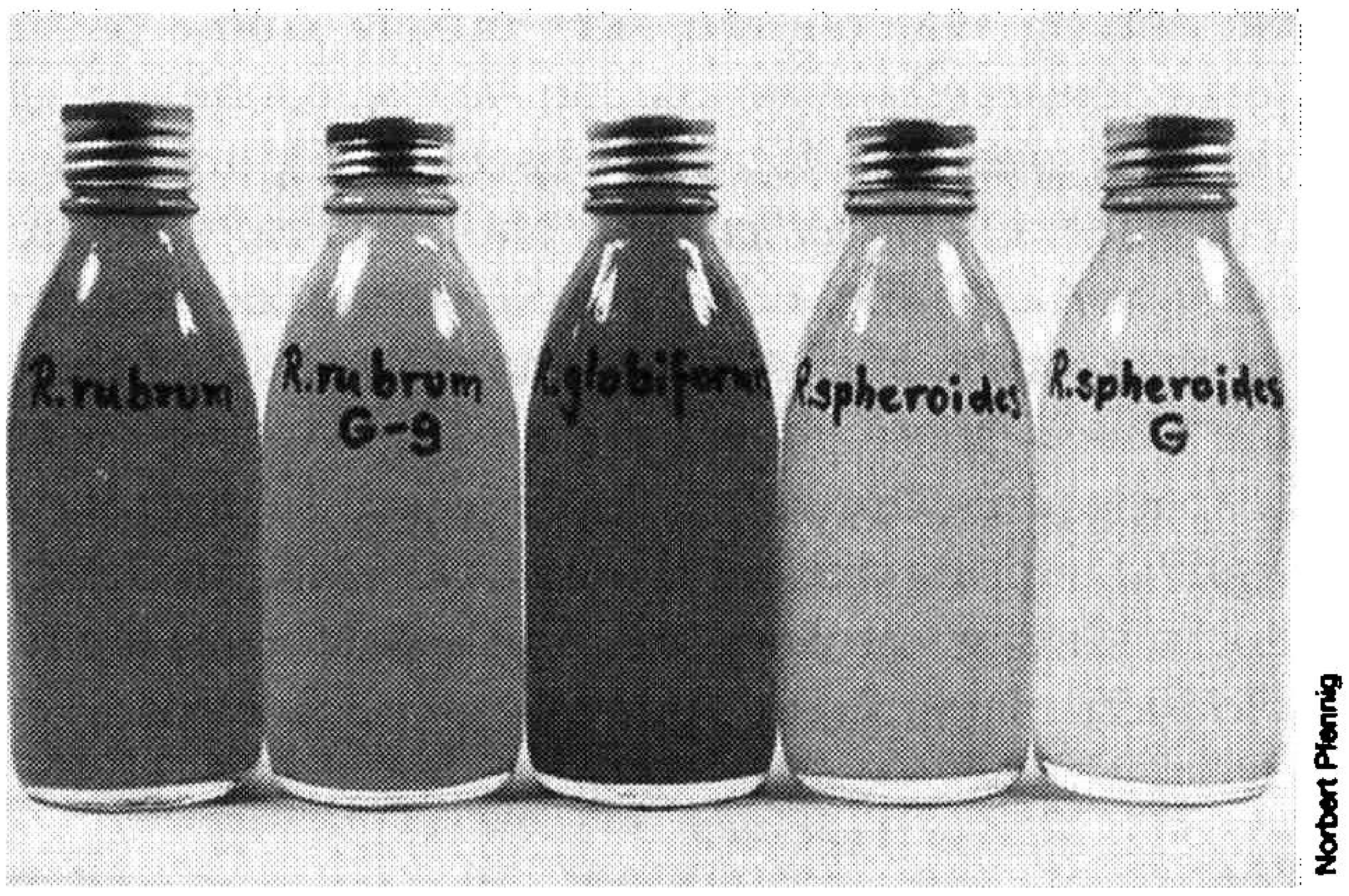


图 12.2　紫色光养细菌的液体培养照片显示不同类胡萝卜素着色后的菌体颜色。 蓝色培养基是深红红螺菌（*Rhodospirillum rubrum*）类胡萝卜素突变体，显示了菌绿素事实上是蓝色。最右边的瓶子［拟球形红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*）菌株 G］与野生型相比缺少一种类胡萝卜素，因此更绿一些。

紫色细菌形成胞质内膜系统，用于色素的附着。这些膜形态多样（图 12.3），但是所有的膜系统都是来自内膜的内折。这些内膜可以使紫色细菌增加它们的色素含量，从而更好地利用有效的光能。当细胞在高光密度下生长时，内膜很少，色素含量很低。相反地，在低光密度下，细胞中充满了内膜和光合色素。

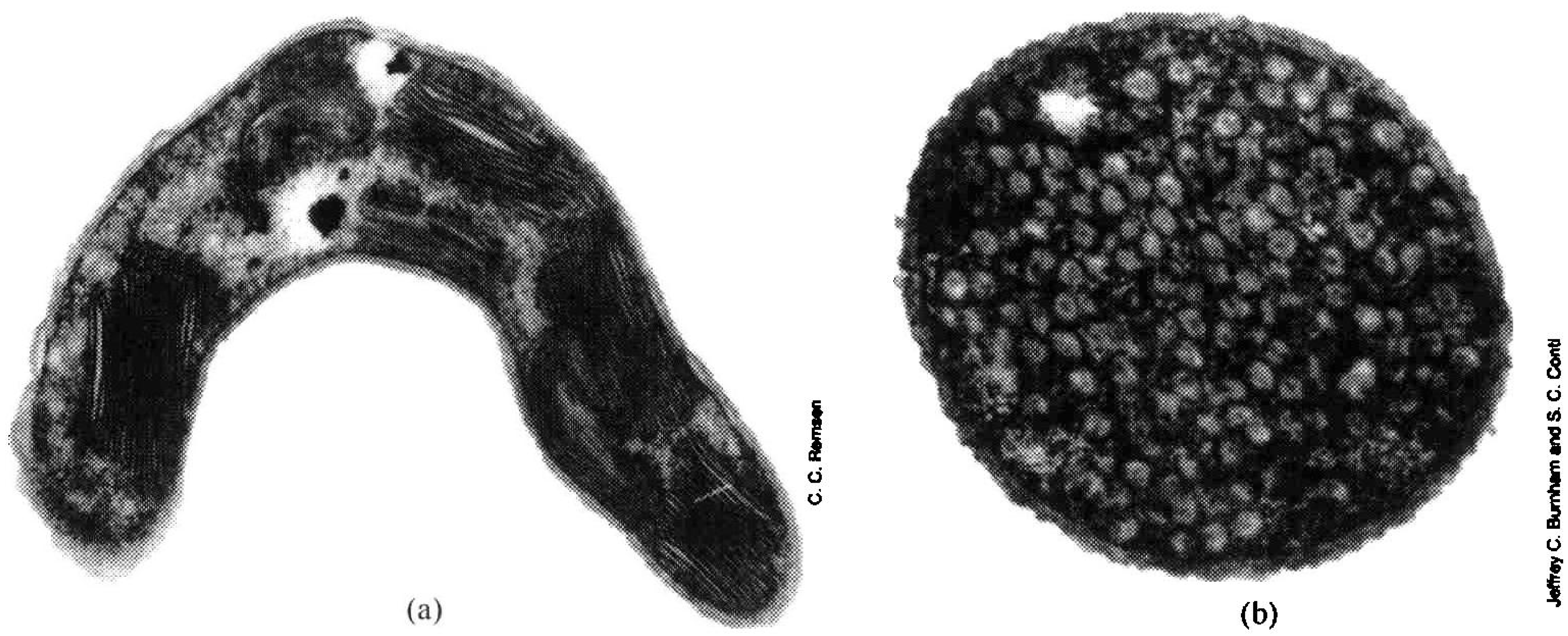


图 12.3　电子显微镜下的光养细菌的膜系统。（a）远红外硫红螺菌（*Ectothiorhodospira mobilis*），一种紫色光养细菌，展示了片层状的光和膜。（b）着色细菌（*Allochromatium vinosum*），另一种紫色光养细菌，展示了多个单泡囊状的膜。

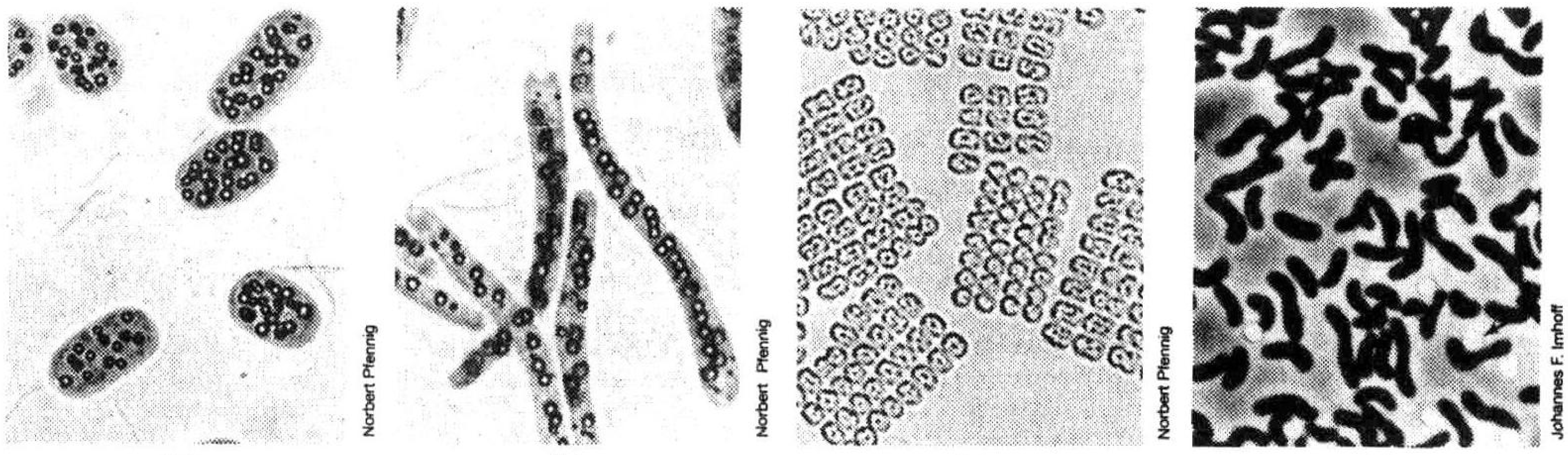
紫色硫细菌

紫色细菌在光合作用中利用 H_2S 作为电子供体还原 CO_2，这类紫细菌称为紫色硫细菌（purple sulfur bacteria）（表 12.2）。S^{2-} 被氧化成单价 S（S^0）呈球状，被储存在细胞中（图 12.4）；最终被氧化成 SO_4^{2-}。许多紫色硫细菌还能利用其他还原态的硫化合物作为光合作用的电子供体，$S_2O_3^{2-}$ 常被用来配制实验室培养基。所有的紫色硫细菌都属于变形细菌的 γ 类群。

表 12.2　紫色硫细菌的属和特性[a]

特性	属和 DNA/（mol %GC）
硫粒沉积在外部	
螺旋状，端生鞭毛	外硫红螺菌属（*Ectothiorhodospira*）（62～67）
螺旋状，极端嗜碱	红硫杆菌属（*Thiorhodospira*）（57）
螺旋状，极端嗜盐	盐红螺菌属（*Halorhodospira*）（50～69）
硫粒沉积在内部	
不含气泡	
卵圆形或杆状，极生鞭毛	着色菌属（*Chromatium*）（48～70）
	等着色菌属（*Allochromatium*）
	盐着色菌属（*Halochromatium*）
	杆状着色菌属（*Rhabdochromatium*）
	嗜热着色菌属（*Thermochromatium*）
	等着色菌属（*Isochromatium*）
	海着色菌属（*Marichromatium*）
球状，嗜碱	硫碱球菌属（*Thioalkalicoccus*）（64）
球状，包含菌绿素 b	硫黄球菌属（*Thioflavicoccus*）（66）
球状	硫红球菌属（*Thiorhodococcus*）（67）
球状，双球菌，4 个菌体聚集，不运动，直径 1.2～3μm	硫匣菌属（*Thiocapsa*）（63～70）
球状或卵圆形，极生鞭毛，直径 2.5～3μm	硫囊菌属（*Thiocystis*）（61～68）
球状，直径 1.5～2.5μm	硫盐匣菌属（*Thiohalocapsa*）（66）
球状，直径 1～2μm	硫红球菌属（*Thiorhodococcus*）（67）
球状，直径 1.2～1.5μm	硫球菌属（*Thiococcus*）（69）
大的螺菌，极生鞭毛	硫螺菌属（*Thiospirillum*）（45）
小的螺菌	硫红弧菌属（*Thiorhodovibrio*）（61～62）
含气泡的	
不规则的球状，4～16 个细胞呈盘状	硫明卵菌属（*Thiolamprovum*）
杆状	闪杆菌属（*Lamprobacter*）（64）
球状，卵圆形，极生鞭毛	闪囊菌属（*Lamprocystis*）（64）
杆状，不运动，形成不规则的网状	网硫菌属（*Thiodictyon*）（65～66）
球状，不运动，形成皿联球菌 S 平板	板硫菌属（*Thiopedia*）（62～64）

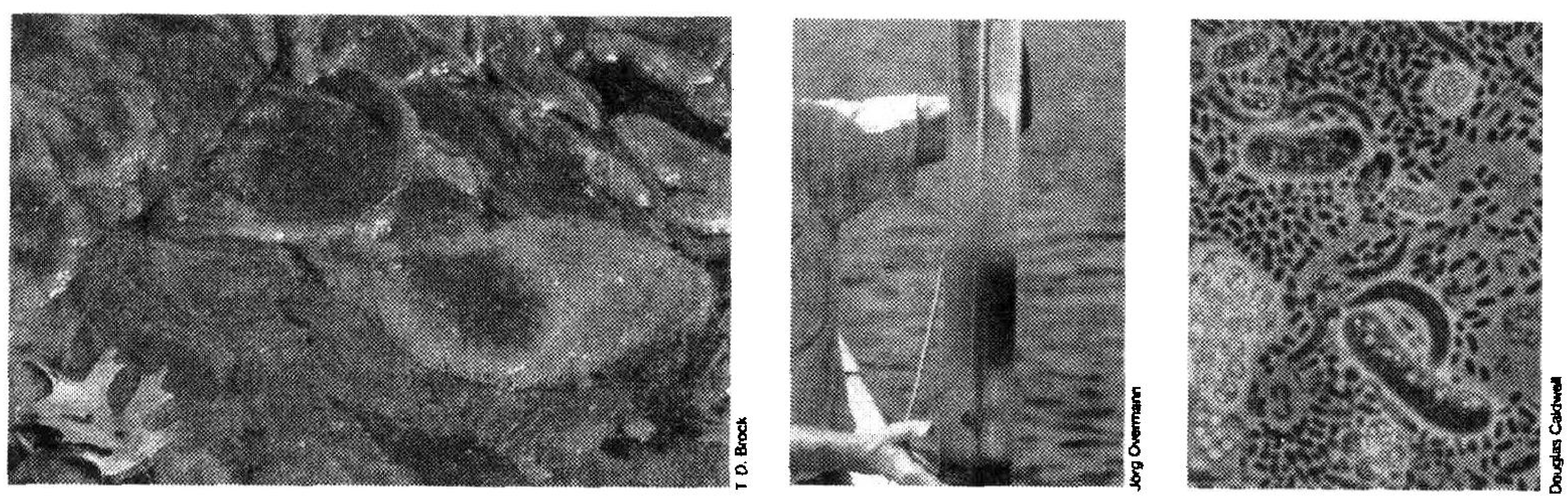
a. 从分类角度看，所有的种类都是变形细菌的 γ 类。



(a) (b) (c) (d)

图 12.4 紫色硫细菌的亮视野显微照片。（a）奥氏着色菌（*Chromatium okentii*），细胞约长 5μm。注意细胞内含硫元素的颗粒。（b）耶拿硫螺菌（*Thiospirillum jenense*），很大，极生鞭毛，螺旋形 30μm 长，注意硫颗粒。（c）玫瑰色板硫菌（*Thiopedia rosea*），细胞约 1.5μm 宽。（d）远动外硫红螺菌（*Ectothiorhodospira mobilis*）的相差显微镜照片，细胞约 0.8μm 宽，注意外面的箭头所指的硫颗粒。比较奥氏着色菌（*Chromatium*）的照片和 115 年前俄罗斯微生物学家 Sergei Winogradsky 画的紫色硫细菌（见 1.7 节和图 1.15）。

紫色硫细菌通常在有光、缺氧的湖区和其他富含 H_2S 的水域被发现。地化作用或生物作用产生 H_2S 的区域，可使紫色硫细菌大量富集（图 12.5）。最容易形成紫色硫细菌的湖泊是分层的（通常是层积湖）。分层湖层积是因为它们底部水密度大（咸水），表面水密度小（淡水）。如果有充足的硫用来支持硫的还原，沉积层中形成的硫化物向上扩散到缺氧的底层水中，在这里紫色硫细菌能够形成大量细胞，称为暴发（bloom），通常伴随有绿色光合细菌的存在（图 12.5c）。



(a) (b) (c)

图 12.5 紫色硫细菌。（a）玫瑰色板硫菌存在于 Madison 的含硫喷泉中。该菌在喷泉的底部生长，当被打断时漂到水面（利用它们的气囊）（见 4.12 节，气囊的进一步讨论）。绿色来自真核的绿藻（图 14.35d）。（b）来自加拿大 *Mahoney* 湖 7m 处的水样。主要的生物是紫红可变杆菌（*Amoebobacter purpureus*）。（c）来自 Michigan 一个层积湖的紫色硫细菌沉积层的相差显微照片。紫色硫细菌包括着色细菌（大的杆状）和硫囊菌属（小球状）。

外硫红螺菌属（*Ectothiorhodospira*）和盐红螺菌属（*Halorhodospira*）与其他紫色硫细菌不同，这些生物体氧化 H_2S 并在细胞外产生 S^0（图 12.4d）。这些菌属十分有趣，因为它们的许多种都是极端嗜盐或者嗜碱的，而且它们在相关已知的原核生物中是最极端的，往往发现于盐湖、碱湖和盐场中。

紫色非硫细菌

有些紫色细菌被称为紫色非硫细菌（purple nonsulfur bacteria），因为最初认为它们不能利用硫化物作为电子供体将 CO_2 还原成为细胞物质。事实上，硫化物能被这个类群中大多数种所利用，只是紫色硫细菌最适硫化物的水平（1～3mmol/L）对于非硫紫色细菌则是有毒害作用的。一些紫色非硫细菌可以利用发酵或厌氧呼吸代谢在黑暗条件下厌氧生长，而大部分可通过呼吸作用在黑暗条件下好氧生长。在后一种条件下，光合作用元件合成受阻，电子供体可以是有机物，而有些种类也可用无机物如 H_2 作电子供体。

然而，由于其巨大的光能异养能力，这类细菌很容易在以有机物为碳源的光养条件下（图 17.1）富集培养。紫色非硫细菌属典型的营养多样型，可利用脂肪、有机物或氨基酸、糖、乙醇，甚至芳香族化合物如安息香酸盐作为碳源。许多种还可以 CO_2 + H_2 或者 CO_2 加低浓度的 H_2S 进行光合自养生长。

进行紫色非硫细菌的富集和分离，使其在添加了有机酸为碳源的无机盐培养基中进行生长。在这种培养基中接种污泥、湖水或者污水样品，并在有光厌氧的地方培养，无一例外地可以培养出紫色非硫细菌。富集过程可以通过去除培养基的固态氮源（如 NH_4^+）或有机氮源（如酵母粉或蛋白胨）并在顶部添加气态 N_2 来实现。实际上所有紫色非硫细菌都能固定 N_2（见 17.28 节），这使得菌株的筛选更有选择性，使菌株生长更加旺盛，而且可以排除其他微生物。

紫色非硫细菌与紫色硫细菌一样都具有形态多样性（表 12.3 和图 12.6），显然在这方面它是异源类群。所有的紫色非硫细菌都属于 α 或 β 类变形细菌（图 12.1）。

表 12.3 紫色非硫细菌的种属及特征[a]

特性	属和 DNA/（mol %GC）
α 变形细菌	红螺菌属（*Rhodospirillum*）（62～68）
螺旋状，端生鞭毛	棕色螺旋菌属（*Phaeospirillum*）
	红弧菌属（*Rhodovibrio*）
	玫瑰菌属（*Rhodothalassium*）
	蔷薇菌属（*Roseospira*）
	玫瑰螺旋菌属（*Rhodospira*）（66）
	玫瑰螺菌属（*Roseospirillum*）（71）
杆状，端生鞭毛；出芽生殖	红假单胞菌属（*Rhodopseudomonas*）（64～72）
	红游动菌属（*Rhodoplanes*）（66～69）
	红菌属（*Rhodobium*）（61～65）
杆状，二分分裂	红细菌属（*Rhodobacter*）（62～71）
卵球至杆状	小红卵菌属（*Rhodovulum*）（64～68）
卵圆形，周生鞭毛，出芽生殖，菌丝生殖	红微菌属（*Rhodomicrobium*）（61～63）
大圆球形，嗜酸（最适 pH5）	红球形菌属（*Rhodopila*）（66）
小球形，嗜碱（最适 pH9）	红细菌属（*Rhodobaca*）（59）
β 变形细菌	
环形或螺旋状	红环菌属（*Rhodocyclus*）（64～66）
弯曲的杆状	红长命菌属（*Rubrivivax*）（70～72）
弯曲的杆状	红育菌属（*Rhodoferax*）（59～60）

a. 所有的菌株都是变形细菌（图 12.1 和表 12.1）。

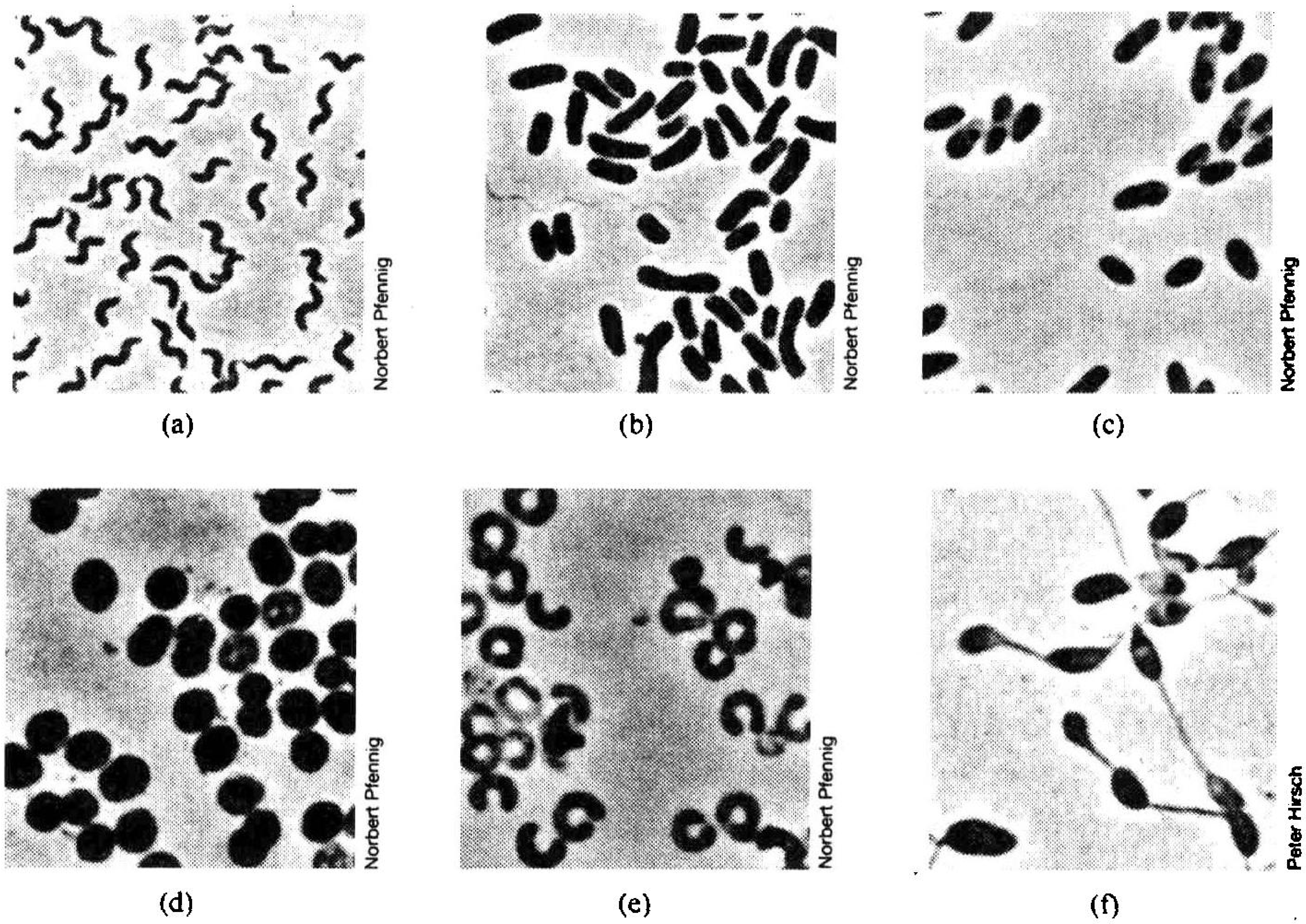


图 12.6 紫色非硫细菌的一些属的代表（见表 12.3）。（a）黄褐棕色螺旋菌属（*Phaeospirillum fulvum*），细胞约长 3μm。（b）嗜酸红假单胞菌（*Rhodopseudomonas acidophila*），细胞约 4μm 长。（c）类球红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*），细胞约 1.5μm 宽。（d）球型球形菌（*Rhodopila globiformis*），细胞约 1.6μm 宽。（e）绛红红微菌（*Rhodocyclus purpureus*），细胞约 0.7μm 宽。（f）万尼氏红微菌（*Rhodomicrobium vannielii*），细胞约 1.2μm 宽。

概念检查

紫色细菌是厌氧光养菌以 CO_2+H_2S（紫色硫细菌）或有机物（紫色非硫细菌）作为碳源。紫色非硫细菌具有生理多样性，大多数能在黑暗中化能有机生长。紫细菌属于变形细菌的 α、β 和 γ 类。

- ◆ 厌氧是指什么？
- ◆ 给出一个主要原因说明为什么紫色非硫细菌不能在有氧条件下进行光合作用。
- ◆ 紫色细菌能不能在无光的条件下生长？

12.3 硝化细菌

代表属：亚硝化单胞菌属（*Nitrosomonas*）、硝化杆菌属（*Nitrobacter*）

细菌中许多种能够营化能无机营养（chemolithotroph）生长。化能无机营养菌的判定依据是：在生理上，它们利用无机电子供体作为能源（在第 17 章有对化能无机营养的定义）。大多数化能无机营养型还能进行自养生长，在这方面与光养菌和蓝细菌具

有统一的生理特性。在这里我们将详细研究化能无机营养菌：那些具有氧化还原硫、氮化合物或 H_2 能力的菌。

亚硝化细菌和硝化细菌

能利用还原态无机氮化合物进行化能无机营养生长的细菌是硝化细菌（nitrifying bacteria）。许多属依照表型和进化或者氧化序列中的特定步骤进行分类（表 12.4）。从进化上讲，硝化细菌分散于变形细菌 5 大类中的 4 个，分别是 α、β、γ、δ 类。硝化螺菌属（*Nitrospira*）在细菌中形成独立的分支（见 12.38 节和图 12.1），并且仅在代谢意义上与其他硝化细菌相关。

表 12.4 硝化细菌的特性

特性	属	分类类群[a]	DNA/（mol%GC）	生境
氧化氨				
革兰氏阴性，短杆至长杆，运动（极生鞭毛）或不运动，外周膜系统	亚硝化单胞菌属（*Nitrosomonas*）	β 变形细菌	45～53	土壤，污水，淡水，海底
大球菌，运动；囊状的或外周膜	亚硝化球菌属（*Nitrosococcus*）	γ 变形细菌	49～50	淡水，海底
螺旋状，运动（有缘毛的鞭毛）；没有明显的膜系统	亚硝化螺菌属（*Nitrosospira*）	β 变形细菌	54	土壤
多型的，叶片状，分隔的细胞，运动（周生鞭毛）	亚硝化叶菌属（*Nitrosolobus*）	β 变形细菌	54	土壤
氧化亚硝酸盐				
短杆，出芽繁殖，偶尔运动（单近末端鞭毛）；排列成极盖似的膜系统	硝化杆菌属（*Nitrobacter*）	α 变形细菌	59～62	土壤，淡水，海底
长的，细长的杆状，不运动。没有明显的膜系统	硝化刺菌属（*Nitrospina*）	δ 变形细菌	58	海底
大球型，运动（一个或两个近末端的鞭毛）；膜系统自由分布于微管中	硝化球菌属（*Ntirococcus*）	γ 变形细菌	61	海底
螺旋形至弧形细胞，不运动，无内膜	硝化螺菌属（*Nitrospira*）	硝化螺菌类	50	海底，土壤

a. 从系统发育角度上讲，所有的硝化细菌都是变形细菌，除了硝化螺菌，这个菌形成单独的进化分支（图 12.1）。

没有单独的化能无机营养型菌株能够单独完成从氨到硝酸盐的氧化。因此，自然界的硝化作用（nitrification）源于两个不同的生物群的顺序作用，即氨氧化菌（ammonia-oxidizing bacterium）——亚硝化细菌（nitrosifyer）（图 12.7）和亚硝酸盐氧化菌（nitrite- oxidizing bacterium）——真正的硝化细菌（图 12.8）。亚硝化菌的属名由典型的“Nitroso”开头，而真正的硝化细菌通常以“Nitro”开头；亚硝化单胞菌属（*Nitrosomonas*）和硝化杆菌属（*Nitrobacter*）是硝化细菌中的代表属（表 12.4）。硝化细菌是历史上最早表现为化能无机营养型的生物。Winogradsky 的研究表明，如果给它们提供 CO_2 作为唯一的碳源，它们能够产生有机物并进行生长（Microbial Sidebar，

Winogradsky's Legacy，第 17 章)。

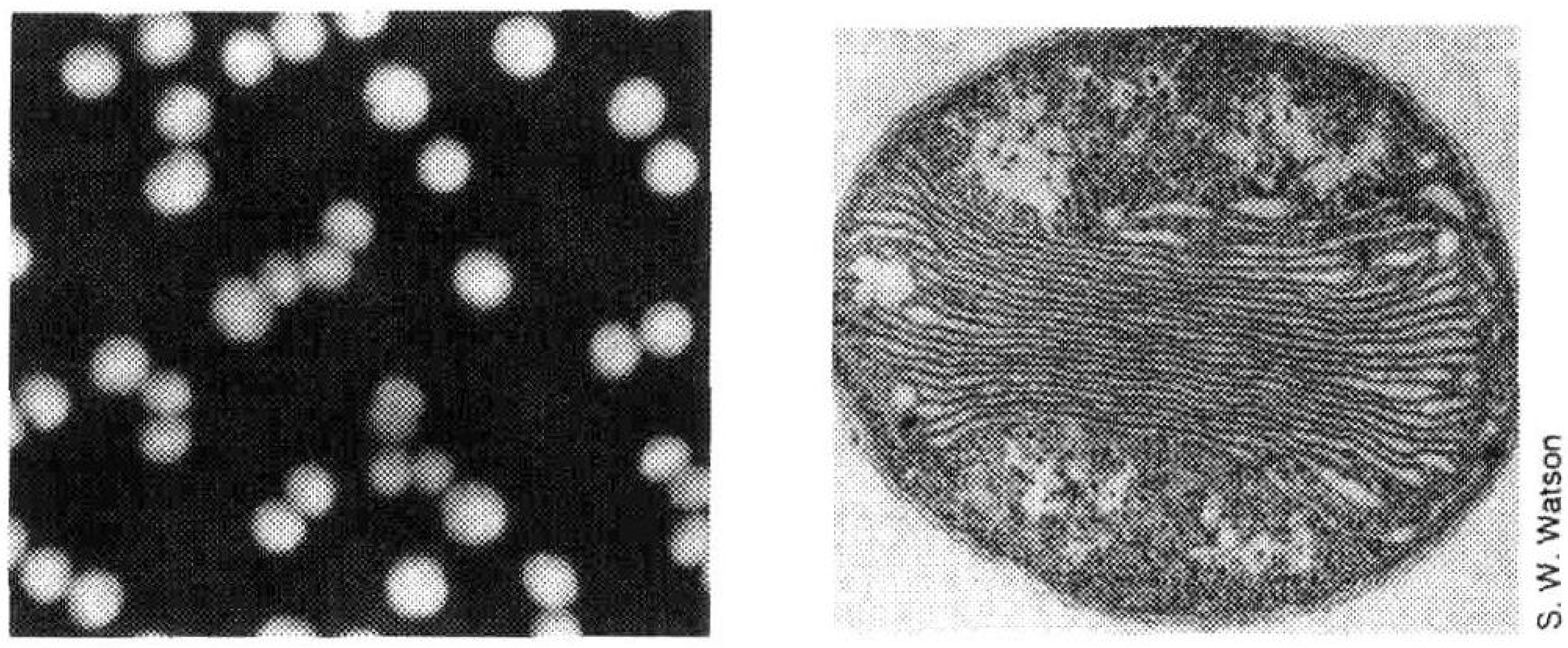


图 12.7 海洋亚硝化球菌（*Nitrosococcus oceani*）的相差显微照片（左）及电子显微照片（右）。单个细胞直径 2μm。

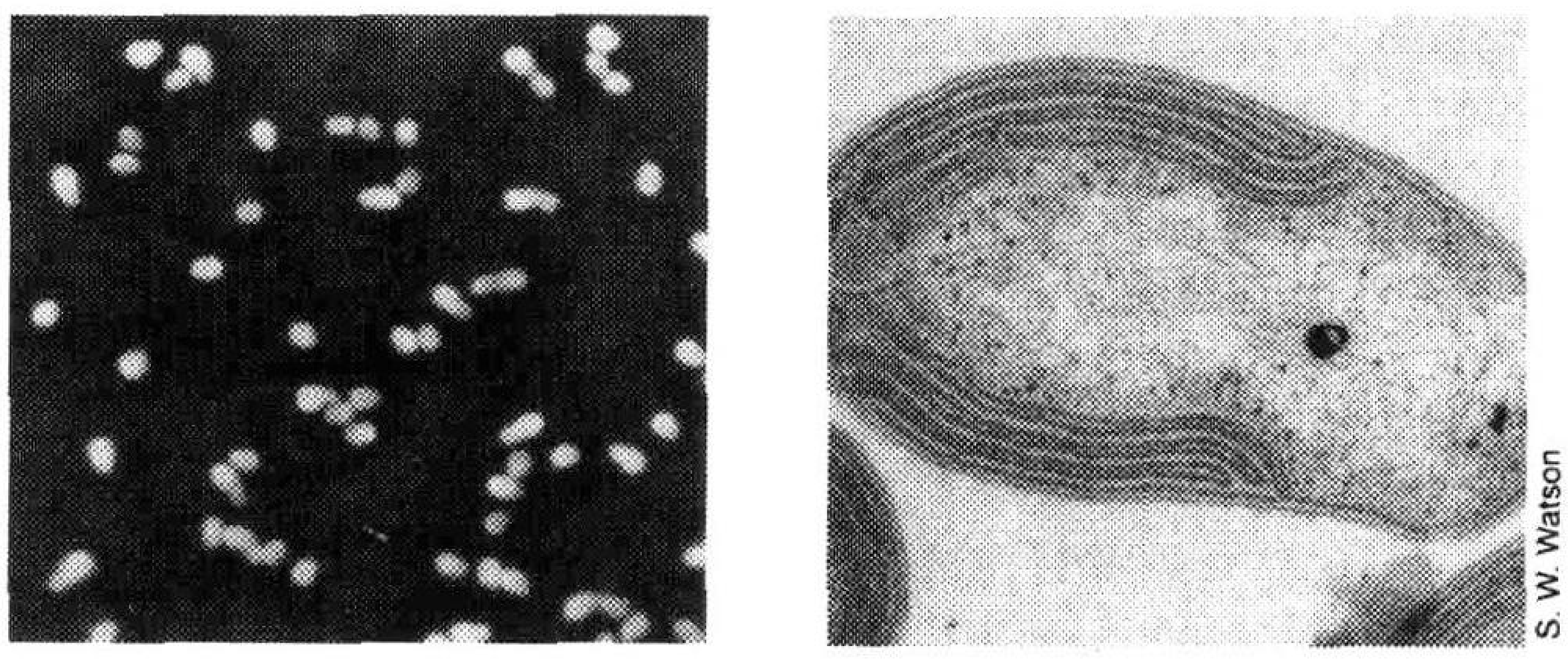


图 12.8 维氏硝化杆菌（*Nitrobacter winogradskyi*）的相差显微照片（左）及电子显微照片（右）。单个细胞直径 0.7μm。

硝化细菌的许多种具有复杂的内膜系统。这些内膜系统在许多方面与它们相近的进化类群（如紫色细菌，见 12.2 节和甲烷氧化菌，见 12.6 节）的内膜系统相似。在硝化细菌中关键酶位于内膜上，氨单加氧酶（ammonia monooxygenase）可以氧化 NH_3（氨）为 NH_2OH（羟胺）；硝酸盐氧化酶（nitrite oxidase）可以氧化 NO_2^- 为 NO_3^-（见 17.12 节）。羟胺可以进一步亚反硝化细菌氧化为 NO_2^-（亚硝酸盐），作为硝化细菌的底物（图 12.9）。

亚硝化细菌

1. $NH_3 + O_2 + 2\,e^- + 2\,H^+ \rightarrow NH_2OH + H_2O$
2. $NH_2OH + H_2O + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_2^- + 2\,H_2O + H^+$

合并：$NH_3 + 1\frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$

$\Delta G^{0\prime} = -288$ kJ/反应

硝化细菌

$NO_2^- + \frac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NO_3^-$

$\Delta G^{0\prime} = -74.1$ kJ/反应

图 12.9 硝化作用。化能无机营养菌对无机氮化合物的氧化反应（图 17.32 和图 17.33）

生态学、分离和培养

硝化细菌广泛存在于土壤和水中。当有大量氨存在时，这种细菌的数量将很多，例如，在一些有蛋白质分解物存在的地点和污水处理厂（见 28.2 节）就是如此。硝化细菌在湖泊和河流的未经处理的下水道污物入口处繁殖得特别好，这是因为下水道污物中氨的含量很高（图 19.10a）。

利用含有氨和亚硝酸盐作为电子供体的选择培养基，并以碳酸氢盐作为唯一碳源可以

进行硝化细菌的富集培养。但如果菌体生长不够旺盛（见 17.12 节），即使存在广泛的硝化作用也没有可见的浊度，所以监测菌体生长的最佳手段就是测定亚硝酸的产量（以氨作电子供体）或亚硝酸的损失量（以亚硝酸为电子供体）。大多数硝化细菌是专性化能无机营养型和专性好氧。硝化杆菌属的菌种是例外，当其以乙酸盐或丙酮酸为唯一碳源和能源时能营化能有机营养生长。厌氧脱氨生物类群在分类上是独特的，能够厌氧氧化氨。

12.4 硫氧化和铁氧化细菌

代表属：硫杆菌属（*Thiobacillus*）、酸硫杆状菌属（*Acidithiobacillus*）、无色菌属（*Achromatium*）、贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa*）

在还原硫化合物时进行化能无机生长是变形细菌中一个类群的特性（表 12.5）。从生态学角度可以把硫氧化细菌划分为两类，即在中性 pH 环境中生活的及在酸性 pH 环境中生活的。其中能够在酸性 pH 下生存的硫化细菌有许多能以亚铁离子为电子供体营

表 12.5　无机化能营养硫氧化细菌的生理生化特性

属和种	无机电子供体	pH 范围	进化类群[a]	DNA/（mol%GC）
在有机培养基上生长不良的种				
排硫硫杆菌（*Thiobacillus thioparus*）	H_2S，硫化物，S^0，$S_2O_3^{2-}$	6～8	β变形细菌	61～66
脱氮硫杆菌（*Thiobacillus denitrificans*）[b]	H_2S，S^0，$S_2O_3^{2-}$	6～8	β变形细菌	63～68
拿波里嗜盐硫杆菌（*Halothiobacillus neapolitanus*）	S^0，$S_2O_3^{2-}$	6～8	γ变形细菌	52～56
硫氧化嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus thiooxidans*）	S^0	2～4	γ变形细菌	51～53
氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）	S^0，金属硫，Fe^{2+}	2～4	γ变形细菌	55～65
在有机培养基上生长良好的菌				
Starkeya novella	$S_2O_3^{2-}$	6～8	β变形细菌	66～68
中间硫杆菌（*Thiobacillus intermedia*）	$S_2O_3^{2-}$	3～7	β变形细菌	64
丝状硫化化能无机营养菌属				
贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa*）	H_2S，$S_2O_3^{2-}$	6～8	γ变形细菌	37～51
发硫菌属（*Thiothrix*）	H_2S	6～8	γ变形细菌	52
辫硫菌属（*Thioploca*）[c]	H_2S，S^0	—	γ变形细菌	—
其他属				
无色菌属（*Achromatium*）	H_2S	—	γ变形细菌	—
硫微螺菌属（*Thiomicrospira*）[c]	$S_2O_3^{2-}$，H_2S	6～8	γ变形细菌	36～44
硫球菌属（*Thiosphaera*）[d]	H_2S，$S_2O_3^{2-}$，H_2	6～8	α变形细菌	66
嗜热丝菌属（*Thermothrix*）	H_2S，$S_2O_3^{2-}$，SO_3^-	6.5～7.5	β变形细菌	—
卵硫菌属（*Thiovulum*）	H_2S，S^0	6～8	ε变形细菌	—

a. 所有的都是变形细菌。

b. 兼性好氧，厌氧生长时使用 NO_3^- 作为电子受体。

c. 未得到纯培养。

d. 泛养硫球菌（*Thiosphaera pantotropha*）与脱氮副球菌（*Paracoccus denitrificans*）有相同的 16S rRNA 序列。

化能无机营养生长。我们将在 19.13～19.16 节中讨论嗜酸性硫氧化和铁氧化细菌的生物地球化学特征，在 17.10 节和 17.11 节中讨论这些过程的生物化学特征。

硫杆菌属和无色菌属

硫杆菌属（*Thiobacillus*）和与其相近的种为 G^- 菌，杆状，在形态上与其他 G^- 杆菌易混淆（图 12.10a）。它们在化能无机营养型硫菌株中研究得最为详细。从进化角度看，硫杆菌属的种分散于变形细菌 5 个类群中的 3 个，分别是 α、β、γ 类群（表 12.5）。硫化物通常被作为硫杆菌化能无机营养生长代谢中的电子供体，如 H_2S、S^0 和 $S_2O_3^{2-}$。产能方程式如下所示：

$$H_2S+2O_2 \rightarrow SO_4^{2-}+2H^+ \qquad \Delta G^{0'}=-798\text{kJ/反应}$$

$$S^0+H_2O+1\frac{1}{2}O_2 \rightarrow SO_4^{2-}+2H^+ \qquad \Delta G^{0'}=-587\text{kJ/反应}$$

$$S_2O_3^{2-}+H_2O+2O_2 \rightarrow 2SO_4^{2-}+2H^+ \qquad \Delta G^{0'}=-818\text{kJ/反应}$$

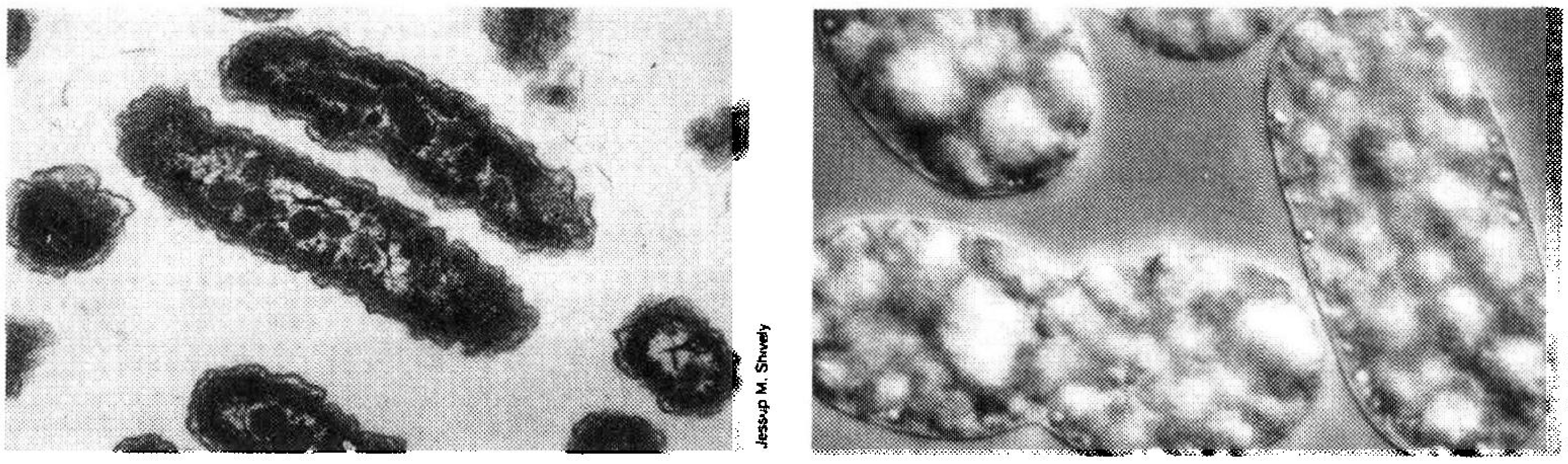
很显然，这些反应可产生大量能量，许多能量储存在 ATP 中，这些 ATP 来自能引起质子移动的电子传递反应（见 17.10 节）。而且，这些反应产生大量的硫酸，因此许多硫杆菌是嗜酸的。一个嗜酸的氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*），能够通过氧化铁离子进行化能无机营养生长，而该菌是引起铁氧化的主要因素（见 19.14 节）。FeS_2 是主要的 Fe^{2+} 源和 S 源。FeS_2 的氧化特别是在采矿中，既是有益的（因为在硫矿中滤去矿石就可以得到铁），又可能造成生态危害（从黄铁矿中得到重金属时可导致环境酸化）（见 19.14 节和 19.15 节）。

无色菌属（*Achromatium*）是一个球形的硫氧化化能无机营养型，通常在含硫的淡水沉淀物中。无色菌属的细胞是大球菌，直径为 10～100μm（图 12.10b）。对自然群体无色菌属的进化分析表明许多种可能存在（可能大小不同），但是还没有得到这个菌的纯培养物。从进化角度看，无色菌属属于变形细菌 γ 类，特别是与紫色光养细菌关系很近，如着色菌属（见 12.2 节）。像着色菌属一样，无色菌属的细胞在胞内储存硫元素（图 12.10b），随后硫氧化成硫酸盐时这些颗粒就会消失。无色菌属的细胞也能够储存大的 $CaCO_3$ 颗粒（图 12.10b），可能作为自养生长的碳源。

培养

一些化能无机营养型硫细菌是专性化能无机营养型，使用无机酸而不是有机酸作为电子供体。当生长在这种条件下时，这些菌是自养型能通过卡尔文循环将 CO_2 转化为细胞物质（见 17.6 节）。羧酶体（carboxysome）通常存在于专性化能无机营养型细胞内部（图 12.10a）。这些结构含有高水平的卡尔文循环的酶，而且当这些细胞固定 CO_2 时细胞数量会增加。

其他化能无机营养型硫细菌是兼性化能无机营养型，兼性的意思是指它们既能营化能无机营养（也能自养）又能营化能有机营养（表 12.5）然而，贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa*）中大多数种能够在缺少卡尔文循环酶的情况下，通过氧化无机硫化物获得能量。因此它们需要有机物作为碳源，这样的生长模式称为兼养微生物（mixotrophy）。

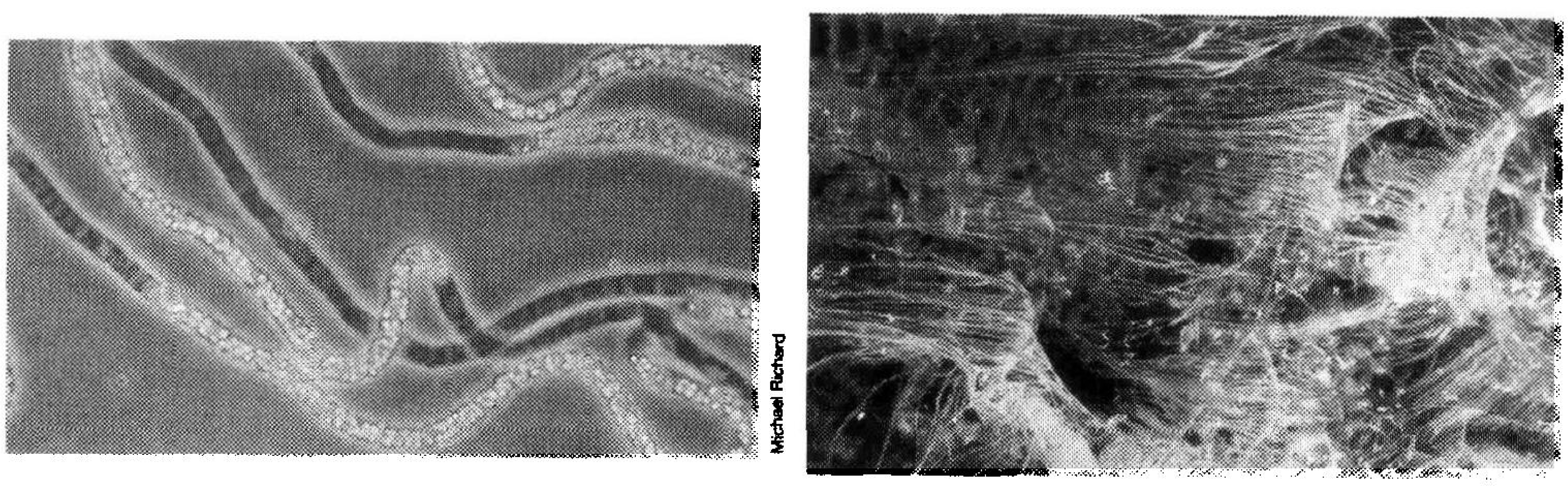


(a)　　　　(b)

图 12.10　非纤维状的化能无机硫细菌。(a) 投射显微照片显示化能无机硫氧化菌拿波里嗜盐硫杆菌（*Halothiobacillus neapolitanus*）的细胞。一个细胞约 0.5μm。箭头所指为分散于细胞内的多面体。(b) 无色菌属。德国的一个小湖中分离出来的细胞，用 Nomarski 光学显微镜照相。靠近细胞外围的球状结构是硫元素（箭头所指），大颗粒包含碳酸钙。一个单独的无色菌属细胞直径约 25μm。

贝日阿托氏菌属

这个菌属的种是细丝状、滑行生长的硫氧化菌。贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa*）的细胞直径和长度通常相当大，在底部有许多短的细胞附着（图 12.11）。鞭毛弯曲盘旋以至于许多鞭毛纠缠在一起丛生。



(a)　　　　(b)

图 12.11　纤维状的硫细菌。(a) 相差显微照片显示从污水处理厂分离的一株贝日阿托氏菌属菌。注意有些细胞中丰富的硫颗粒。(b) 在一个含硫喷泉得流出物中的硫氧化菌。纤维状细胞聚集在一起形成长丝，呈白色是由于胞内含丰富的硫元素。

贝日阿托氏菌属首先在富含 H_2S 的自然界中发现，如硫泉中（图 12.11b）、有腐烂海草的海底、湖的泥层和污水污染的水域。在这些环境中，典型的贝日阿托氏菌属的鞭毛被硫颗粒填充（图 12.11a）。贝日阿托氏菌属通常存在于热水排放处（见 19.8 节）。Winogradsky 首先论证了贝日阿托氏菌可以氧化 H_2S 为 S^0，进一步氧化为 SO_4^{2-}，并提出化能无机营养的概念（Microbial Sidebar，Winogradsky's Legacy，第 17 章）。虽然贝日阿托氏菌属的一些菌是真正的化能无机自养，但是大多数是兼养生长，以还原硫化物作为电子供体，有机物作为碳源。

贝日阿托氏菌属的一个令人感兴趣的生境是水生植物的根系（水稻、香蒲和其他湿地植物），以及缺氧的土壤。这些植物将氧传输到根部，因此一个严格定义有氧和无氧的界线在根部和土壤之间划分开来。贝日阿托氏菌属（及其他可能的硫杆菌）在这种界线中发展起来，并且通过氧化 H_2S 使植物受益。

贝日阿托氏菌属和其他的长鞭毛的菌如球衣菌属（*Sphaerotilus*）（见 12.15 节）在污水处理厂和来自罐头制造、废纸碎浆、酿造工业的废水氧化塘中能够造成严重的沉积问题，称为“污泥膨胀”（bulking）。当长鞭毛的细菌属像贝日阿托氏菌属那样过量繁殖超过废水系统的正常水平时，产生一种岩石碎屑样的絮状物，而不是正常的更容易安置的包含动胶菌属和相关污水菌的紧密的絮状物（见 28.2 节）。如果污泥膨胀现象发生，废水就不能处理，因为有机物含量仍然很高（见 28.2 节）。

辫硫菌属和发硫菌属

其他的具鞭毛的硫氧化细菌包括有辫硫菌属（*Thioploca*）和发硫菌属（*Thiothrix*）。辫硫菌属是一种大的，长鞭毛的化能无机营养硫细菌，能够形成有外壳包裹的细胞束（图 12.12）。辫硫菌属在远离智利和秘鲁海岸的海底厚的沉积层中被发现。对这些微生物的生态学研究表明，它们能进行 H_2S 的厌氧氧化，同时能够将 NO_3^- 还原为 NH_4^+（见 17.4 节和 19.12 节）。有趣的是，研究表明辫硫菌属的细胞能够在胞内聚积大量的硝酸盐，而且这些硝酸盐能够利用 H_2S 作为电子供体进行厌氧呼吸。这些海底辫硫菌的沉积层可能固定大量的 CO_2，并且在硫和氮循环起到重要作用。与贝日阿托氏菌的沉积层相似的沉积层在热水排放口附近发现（见 19.18 节），但是与硝酸盐呼吸的关系还没有得到证实。

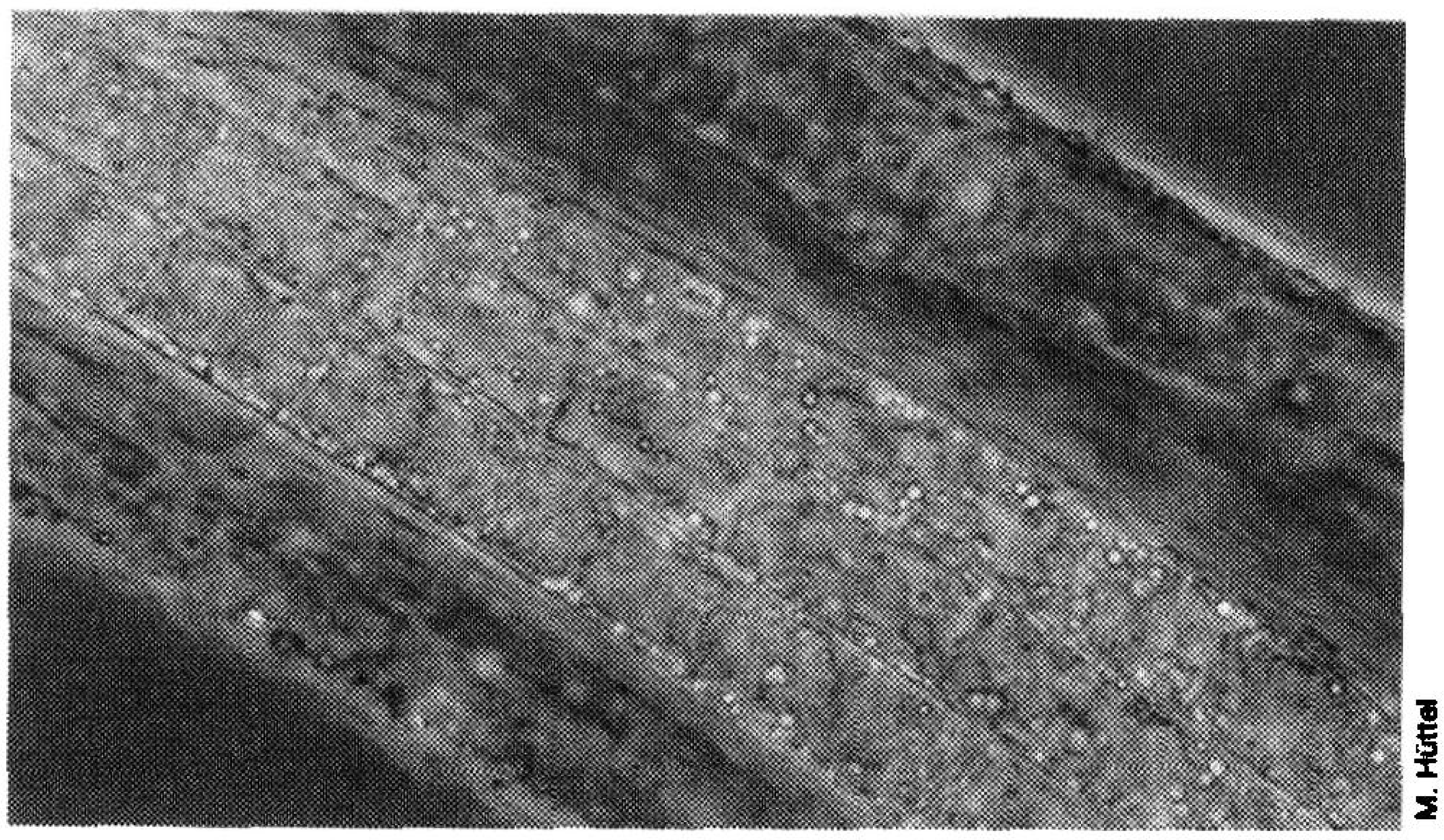


图 12.12　海底辫硫菌（*Thioploca*）的大细胞。细胞含有硫颗粒（黄色）40～50μm 宽。

发硫菌属是一种长鞭毛的化能无机营养硫细菌，鞭毛在末端聚集成团，紧密形成细胞阵列，称为纤毛漏斗（rosette）（图 12.13）。从生理角度看，发硫菌属是一种专性需氧兼养微生物，与贝日阿托氏菌属有许多共同之处。

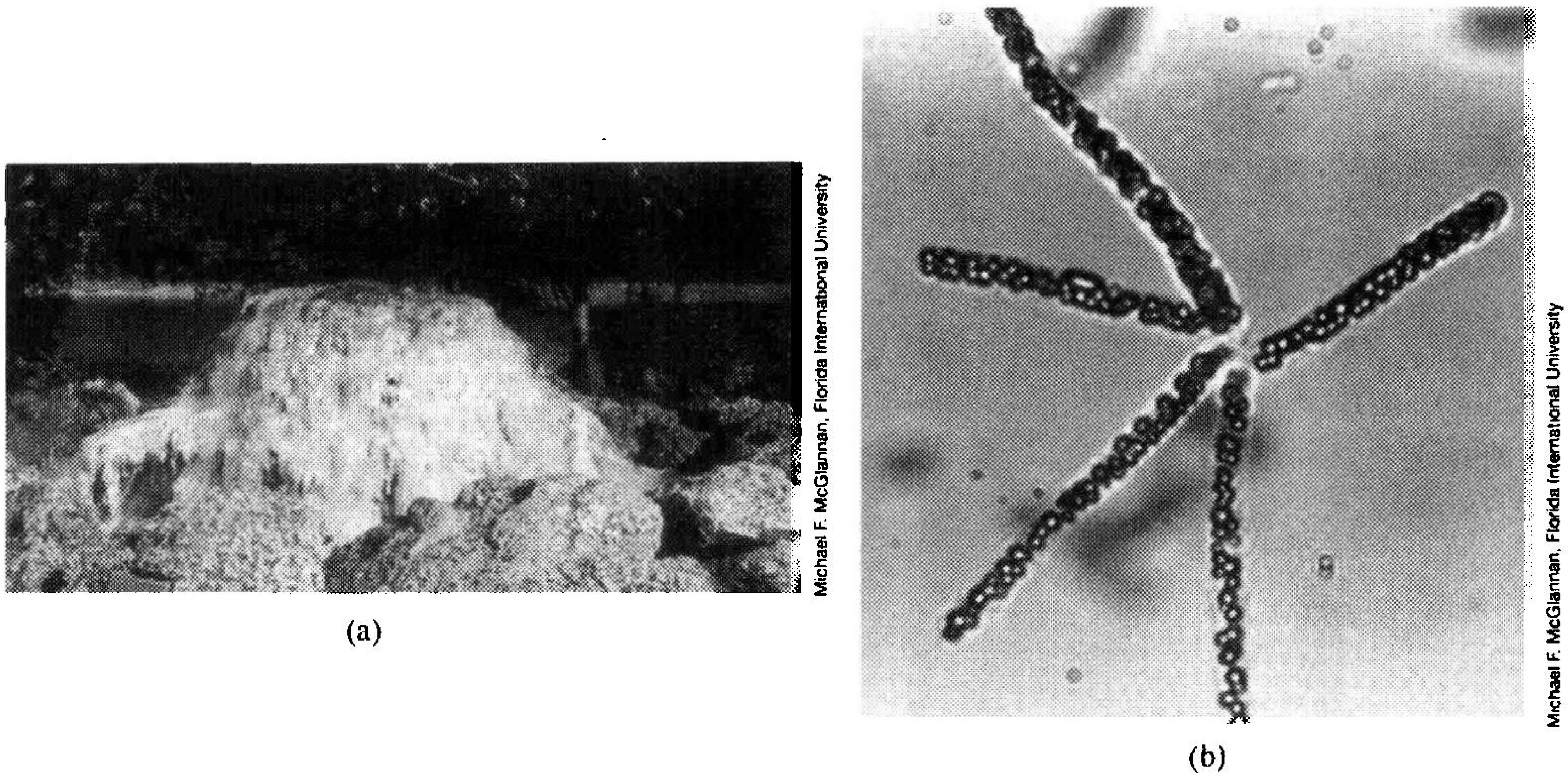


图 12.13　发硫菌属（*Thiothrix*）。（a）美国佛罗里达州的一个含硫的自流喷泉。喷泉外便被发硫菌包被，直径 1.5μm。（b）相差显微照片显示在喷泉中分离并纯培养的一株发硫菌。注意内部的硫氧化产生的硫颗粒。每个鞭毛直径 4μm。

12.5 氢氧化细菌

代表属：罗尔斯通氏菌属（*Ralstonia*）和副球菌属（*Paracoccus*）

许多细菌都能利用氢的氧化反应“knallgas”，以 H_2作为唯一电子供体，O_2为电子受体而生长，其能量代谢方式：

$$H_2+\frac{1}{2}O_2\rightarrow H_2O \qquad \Delta G^{0'}=-237\text{kJ/反应}$$

大多数这种细菌能营自养生长（利用卡尔文循环反应掺入 CO_2），我们把这些菌归为化能无机营养型氢氧化细菌。已知的此类菌中既有 G^+ 也有 G^-，研究得最深入的代表属有：罗尔斯通氏菌属（图 12.14）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、副球菌属（表 12.16）。所有的氢氧化菌含有一个或多个氢化酶，其作用是与 H_2结合并用之形成 ATP 或者为自养生长提供还原能（表 12.6）。

表 12.6　氢-氧化细菌各种属之间的不同特性

属和种	反硝化	在果糖上生长	游动性	分类类群[a]	DNA/(mol%GC)	其他特性
革兰氏阴性						
敏捷食酸菌（*Acidovorax facilis*）	—	+	+	β变形细菌	64	膜结合氢化酶
富养罗尔斯通氏菌（*Ralstonia eutropha*）	+	+	+	β变形细菌	66	膜结合及细胞质的氢化酶
木糖氧化产碱菌（*Achromobacter xylosoxidans*）	—	+	+	β变形细菌	—	膜结合及细胞质的氢化酶

续表

属和种	反硝化	在果糖上生长	游动性	分类类群[a]	DNA/(mol%GC)	其他特性
自养水螺菌（*Aquaspirillum autotrophicum*）	—	—	+	β变形细菌	61	膜结合氢化酶
食羧假单胞菌（*Pseudomonas carboxydovorans*）	—	—	+	γ变形细菌	60	膜结合氢化酶，也氧化 CO
黄色氢噬胞菌（*Hydrogenophaga flava*）	—	+	+	β变形细菌	67	菌落为明亮的黄色
脱氮副球菌（*Paracoccus denitrificans*）	+	+	—	α变形细菌	66	膜结合氢化酶，强反硝化作用
嗜火产液菌（*Aquifex pyrophilus*）	+	—	+	产液菌群[b]	65	嗜热，微需氧的或厌氧生长（NO_3^-）兼性化能无机营养；能以 S^0 或 $S_2O_3^{2-}$ 为电子供体
嗜热氢杆菌（*Hydrogenobacter thermophilus*）	—	—	—	产液菌群[b]	37～46	与产液菌相似，但专性需氧（微需氧）
革兰氏阳性						
施氏芽孢杆菌（*Bacillus schlegelii*）	—	—	+	低 GC 革兰氏阳性[c]	66	产生内生孢子，嗜热，也用 CO 或 $S_2O_3^{2-}$ 为电子供体
节杆菌属（*Arthrobacter* sp.）	—	+	—	放线菌[d]	70	膜结合氢化酶
戈登分枝杆菌（*Mycobacterium gordonae*）	—	?	—	放线菌[d,e]	—	抗酸；菌落为黄色到橙色

a. 需氧氢细菌是变形细菌，列举的除外。
b. 见 12.37 节。
c. 见 12.20 节。
d. 见 12.22 节。
e. 见 12.23 节。

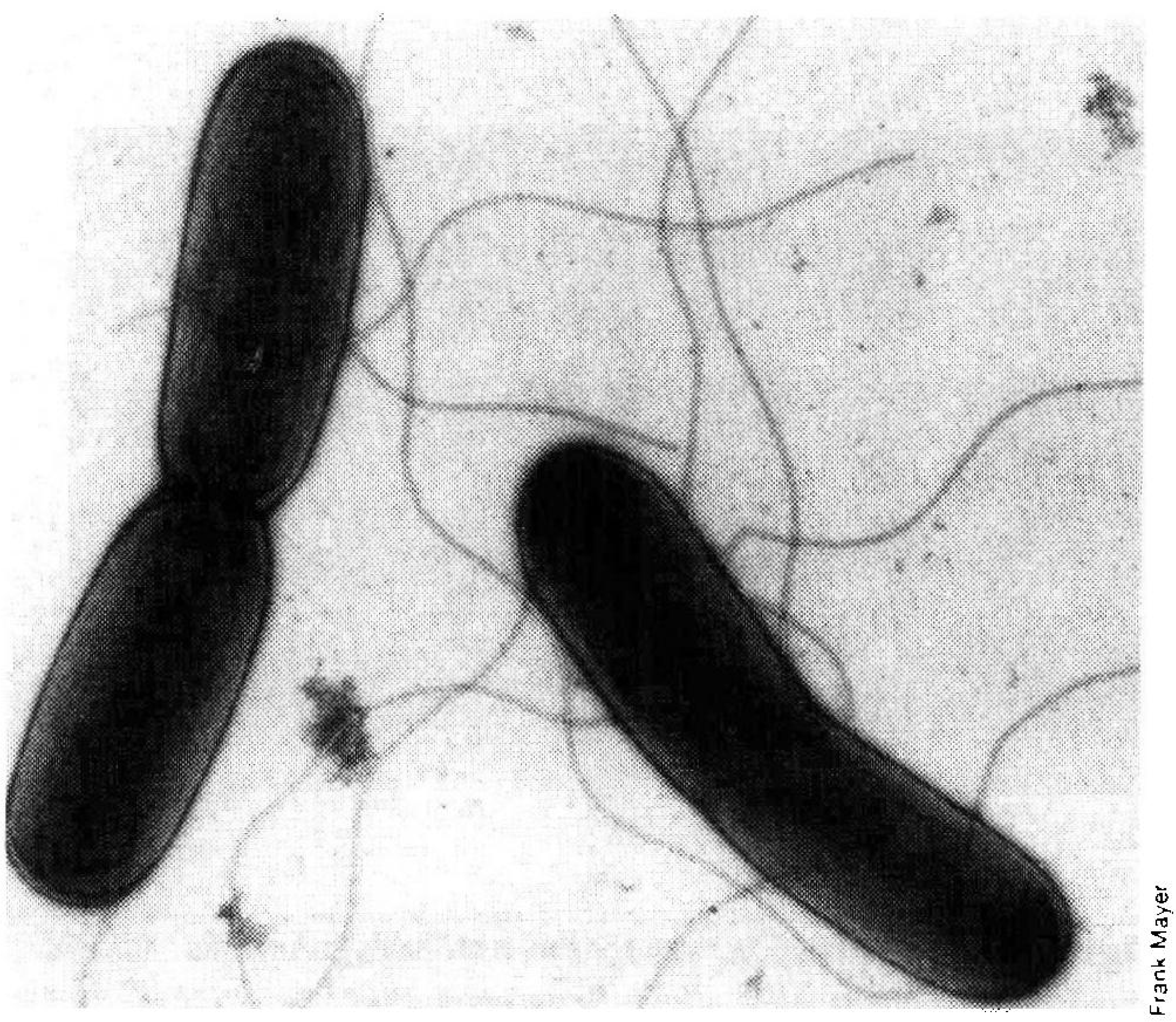


图 12.14　氢细菌。革兰氏阴性化能无机营养氢氧化菌富养罗尔斯通氏菌（*Ralstonia eutropha*）的透射显微照片。一个细胞直径 0.6μm，有许多鞭毛。

几乎所有的氢细菌都是兼性化能无机营养菌，这表明它们也能够利用有机物作为能源进行化能有机营养生长，这一点明显区别于其他许多硫化菌和硝化菌；这一类群的代表属大多数是专性化能无机营养型——在缺乏无机能源时不能生长。相比之下，氢化能无机营养细菌则可利用自然界所提供的不同营养在化能无机营养与化能有机营养代谢方式之间自由转化。

氢细菌的生理学和生态学

当有 H_2存在进行化能无机生长时，大多数氢细菌能在微好氧条件下较好生长，因为氢化酶是氧敏感酶。尤其是当氧气浓度为 5%～10%时长得最好。由于镍是氢化酶的金属辅因子，所以氢细菌必须在含有镍的培养基上才能生长。有少数的氢细菌还能固定 N_2，当在 N_2中生长时，由于还原 N_2的固氮酶是一个氧敏感的酶，所以使得菌体对氧特别敏感（见 17.28 节）。

氢氧化菌相对较容易分离。用少量的无机盐培养基，含微量的金属离子（特别是 Ni^{2+}和 Fe^{2+}）以土样或水样接种，培养于大的密封的三角瓶中，其内需含有 5%O_2、10%CO_2和 85%H_2。当培养液变浑后，在含有相同气体混合物的玻璃容器内于同样的固体培养基上划线分离（必须注意，O_2和 H_2混合易引起爆炸）。

CO 氧化

一些氢细菌能够利用 CO 作为电子供体生长。来自于 CO 氧化为 CO_2的电子进入电子传递链而导致 ATP 的形成。CO 氧化细菌称为 CO 营养细菌，可利用卡尔文循环与 CO 氧化的 CO_2结合，营自养生长。CO 氧化为 CO_2是由碳单氧脱氢酶所催化的，该酶是一种含钼的酶。钼在 CO 脱氢酶中与由多环结构蝶呤组成的辅因子结合，这与硝酸盐还原酶的情况相似（见 17.14 节）。

一氧化碳菌对 CO 的利用，在生态学上具有重要的意义。尽管大量的 CO 是由人类和其他来源产生，但是多少年来 CO 在空气中的含量并没有显著上升。其原因可能是微生物对 CO 的消耗。在无氧条件下，CO 由特有的光合细菌——产甲烷菌和硫还原细菌所氧化。不过 CO（主要来自于汽车尾气、燃料不完全燃烧的气体和木质素的分解）主要还是释放到有氧环境中。因此，土壤表面的一氧化碳细菌是自然界中最重要的 CO 消耗来源。

研究得最为深入的一氧化碳菌有：假单胞菌属如食羧假单胞菌（*Pseudomonas carboxydovorans*）（表 12.6），至少有一种一氧化碳细菌可以以硝酸盐为电子受体利用 CO 厌氧生长，但这点并不是此类菌的普遍性质。与氢细菌相似，所有分离到的一氧化碳菌，都可以像利用 CO 一样在有机物质上生长。

概念检查

化能无机营养细菌是一种可以氧化无机电子供体并在许多情况下用 CO_2作为唯一碳源的微生物。

◆ 比较硝化细菌与硫细菌、铁细菌和氢细菌在无机电子供体利用、碳源、电子供

体的 E'_0 及其生存环境方面的异同点。

◆ 在化能无机营养菌中同化 CO_2 的主要途径是什么？

12.6 甲烷营养菌和甲基营养菌

甲烷（CH_4）广泛存在于自然界中，由产甲烷菌在缺氧环境中产生（见 13.4 节和 17.7 节），并且是缺氧的泥潭、沼泽、湖泊的缺氧带、瘤胃及哺乳动物肠道中的主要气体组分。甲烷是天然气的主要成分而且也存在于许多煤矿中。

甲烷是一种相对稳定的分子，但是许多甲烷营养菌（methanotroph）可以氧化它。这些细菌利用甲烷和其他一些少量的单碳化合物作为能源及唯一的碳源。这些菌均是好氧菌，广泛存在于自然界的土壤和水中，它们在形态上具有多样性，但在系统发生上和氧化甲烷的能力上具有相关性。甲烷在海底沉积层中不多，因为这里主要的厌氧呼吸是由硫还原菌进行而非产甲烷菌。

C_1 代谢

除了甲烷以外，还有许多其他已知的一碳化合物可被微生物利用（表 12.7）。从生化角度看，它们都有一个相同的重要特性：没有 C—C 键。因此，细胞中的 C—C 键必须从头合成。能够利用一碳化合物生长的生物通称为甲基营养菌（methylotroph）。一些甲基营养菌（但不是全部）同样是甲烷营养菌。然而，甲烷营养菌的特殊之处在于，它们不仅能够在氧化型的一碳化合物上生长（表 12.7）也能在甲烷中生长。

表 12.7 甲基营养细菌利用的底物[a]

Ⅰ. 生长利用的底物	Ⅱ. 底物氧化但不利于生长
甲烷[b]	胺
甲醇	乙烯
甲胺	氯代甲烷
二甲基胺	溴代甲烷
三甲基胺	较高的碳氢化合物（乙烷、丙烷）
四甲基胺	
氮氧三甲基胺	
三甲基磺	
草酸根	
甲酰胺	
一氧化碳	
乙酸甲酯	
二甲基亚砜	
二甲基硫醚	

a. 对于一个分离株来说，它并不会利用上面所列的所有底物，但是至少有一种甲基营养细菌被报道能够氧化上面所列的化合物中的一种。

b. 能够氧化甲烷的甲基营养菌称为甲烷营养菌。

甲烷营养菌还有一个特殊的酶——甲烷单氧化酶（methane monooxygenase），用来将一个氧原子引进甲烷中导致甲醇的产生（见 17.24 节）。在甲烷氧化的起始阶段对 O_2 的需求，解释了为什么这些甲烷营养菌是专性好氧的（见 17.24 节，甲烷能够在缺氧条件下进行特殊生物氧化）。所有的甲烷营养菌都是专性 C_1 化合物利用菌，而不能利用具有 C—C 键的化合物。相比之下，许多非甲烷营养菌的甲基营养菌却能利用有机酸、乙醇和糖。

甲烷氧化细菌在原核生物中是独特的，因为它包含大量的固醇。正如我们在 4.5 节中所提到的，固醇是真核生物膜系统的功能部分，但在大多数原核生物里不存在。在甲烷氧化菌中，固醇可能是与甲烷氧化作用有关的复杂内膜系统的基本组成部分。原核生物其他类群中固醇仅广泛存在于无细胞壁的支原体中。

甲烷营养菌的分类

在表 12.8 中总结了甲烷营养菌的分类。这些细菌最初是根据形态及静息阶段的形式来加以区分的，但后来发现，根据它们的内部细胞结构及碳同化作用途径可将其分为两大类。Ⅰ类通过核酮糖单磷酸循环（ribulose monophosphate cycle）来进行一碳化合物的同化作用是变形细菌的 γ 类；而Ⅱ类是通过丝氨酸途径（serine pathway）来同化 C_1 中间产物的，属于变形细菌的 α 类（表 12.8）。我们将于 17.24 节讨论这些途径的生化细节。

表 12.8 甲烷营养菌的一些特性

菌体	形态	16S rRNA 类型[a]	休眠期	内膜[b]	三羧酸循环[c]	碳同化途径[d]	N_2 固定	DNA/(mol%GC)
甲基单胞菌属 (*Methylomonas*)	杆状	γ 变形细菌	囊状体	Ⅰ	不完全	核酮糖-磷酸	无	50～54
甲基微球菌属 (*Methylomicrobium*)	杆状	γ 变形细菌	无	Ⅰ	不完全	核酮糖-磷酸	无	49～60
甲基杆菌属 (*Methylobacter*)	球形至椭圆形	γ 变形细菌	囊状体	Ⅰ	不完全	核酮糖-磷酸	无	50～54
甲基球菌属 (*Methylococcus*)	球形	γ 变形细菌	囊状体	Ⅰ	不完全	核酮糖-磷酸	是	62～64
甲基弯曲菌属 (*Methylosinus*)	杆状或弧状	α 变形细菌	外孢子	Ⅱ	完全	丝氨酸	是	63
甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*)	杆状	α 变形细菌	外孢子	Ⅱ	完全	丝氨酸	是	63
甲基纤维菌属[e] (*Methylocella*)	杆状	α 变形细菌	外孢子	Ⅱ	完全	丝氨酸	是	61

a. 所有的变形细菌。
b. 内膜：类型Ⅰ，在菌体中贯穿分布着成束的碟状小泡；类型Ⅱ，沿着细胞的周边分布着成对的膜。
c. 拥有不完全的三羧酸循环的细菌缺少 α-酮戊二酸脱氢酶。
d. 见图 17.59 和图 17.60，与其他甲烷营养菌不同的是，甲基球菌属含有卡尔文循环酶。
e. 嗜酸，pH5 生长最好。

两种类型的甲烷营养菌都含有丰富的内膜系统，这与其氧化甲烷的能力有关。类型Ⅰ的细菌其内膜为成束的盘状囊分布于整个细胞内，而类型Ⅱ沿着细胞的外周拥有成对的膜（图 12.15a）。其关键酶甲烷单加氧酶位于这些膜上。

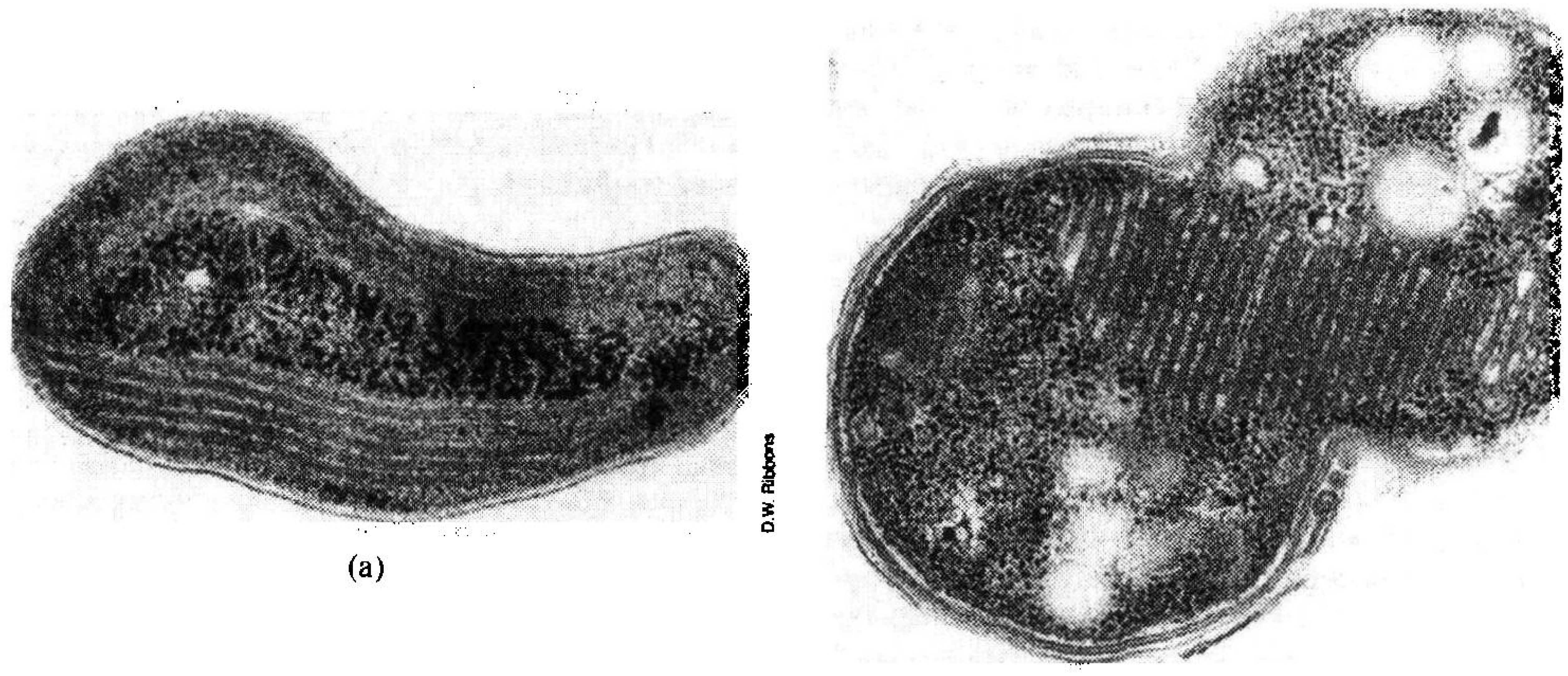


图 12.15 甲烷营养菌的电子显微镜照片。(a) 一个甲基弯曲菌(*Methylosinus*)表明的是类型Ⅱ膜系统，细胞直径 0.6μm。(b) 荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*)表明的是类型Ⅰ膜系统，细胞直径 1μm。

类型Ⅰ的甲烷营养菌缺少一套完整的柠檬酸循环（缺少 α-酮戊二酸脱氢酶），而类型Ⅱ则拥有完整的循环。缺少完整的柠檬酸循环在很大程度上降低了该类细菌利用有机物的能力，因为如果循环不完整，则 NADH 就无法形成，若该菌利用的有机物要通过柠檬酸循环进行代谢，这些菌的生长将受到抑制。因此类型Ⅰ甲烷营养菌是专性的甲基营养菌。

生态学和分离

甲烷营养菌广泛存在于海洋和陆地环境中，有稳定甲烷资源的地方都有它们的踪迹。甲烷产生于湖泊的无氧区，而甲烷营养菌常集中在有氧区与无氧区的交界带。甲烷营养菌在碳循环中的角色虽小，但作用可能很重要，它们能够将甲烷分解后转化为细胞物质和 CO_2。

对甲烷营养菌的富集较为容易，所需的只是矿物盐培养基及含 80%甲烷和 20%空气的气体空间。可在矿物盐平板上划线并于含有甲烷与空气混合气体的容器中进行培养。出现的菌落有两种类型，化能有机营养菌利用培养基中微量的有机物质 1～2d 就可长出，而甲烷营养菌在 1 周后才会出现。由于产胡萝卜素，许多产甲烷菌菌落为粉红色，这种特性有助于分类。

甲烷营养菌和亚硝化细菌

甲烷营养菌能够氧化氨，虽然它们不能利用氨为唯一电子供体进行化能无机营养。除了氧化甲烷，甲烷单加氧酶也可氧化氨，而且这两种物质间也存在着竞争。因此，总的来说，氨对甲烷营养菌是有毒的，它们更喜欢的氮源是硝酸盐。

有研究表明，甲烷营养菌有可能是那些通过基因突变导致氨氧化酶转变为甲烷氧化酶的硝化细菌的突变株。这两种菌群都具有完善的内膜系统（见 12.3 节），并且从进化

角度上非常相近也支持了这一理论。此外，甲烷营养菌与同属于原核生物的产甲烷细菌都具有相同的基因，产生相同的蛋白质，所有这些菌从分类上看都是古生菌（见 13.4 节）。这些结果表明，在甲烷的生化代谢的数百万年中进化，这些种群发生了横向基因转移（见 15.8 节）。我们将在 17.17 节和 17.24 节讨论在这方面甲烷营养菌和甲基营养菌的差异。

动物的甲烷氧化共生生物

甲烷营养细菌与特定的海底贝类和海绵之间发展了共生关系。一些贝类生活在烃物质渗漏的海底附近，那里也有大量的甲烷存在。当 O_2 存在时，分离的贝类鳃组织，消耗甲烷的速度都非常快。在这些组织中有大量的球形细菌（图 12.16a)。细菌共生体含有与典型的Ⅰ型甲烷营养菌相似的大量的胞质内膜（图 12.16b)。在动物鳃表面细胞内的液泡中发现有共生物，可以保证其与海水进行有效的气体交换。这些共生体已通过核糖体测序鉴定，证实是甲烷营养菌。

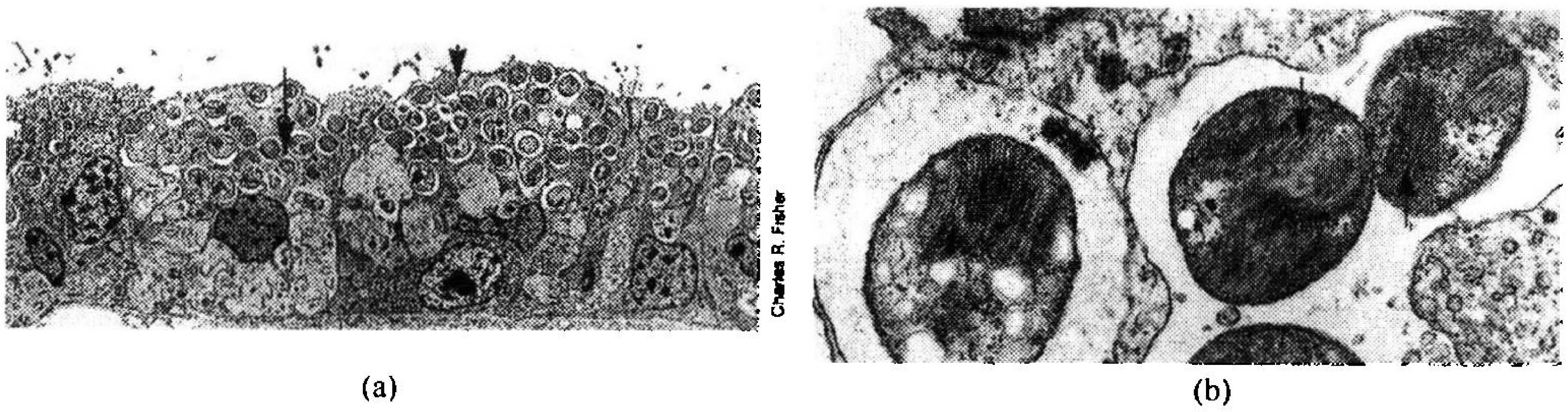


图 12.16　海底贝类的甲烷共生体。(a) 在墨西哥湾烃泄漏区生活的海底贝类小部分鳃的局部放大的电子显微照片。箭头所指为组织内的甲烷菌共生体。(b) 鳃组织中Ⅰ型甲烷营养菌的高倍放大照片。箭头所指为膜。甲烷菌直径约 1μm，与图 12.12b 相比较。

贝类中的甲烷营养菌利用甲烷主要通过甲烷营养菌的有机排泄物分布于动物体内。因此，甲烷营养菌的共生体从概念上讲与那些在化能无机硫氧化菌和热水排放口处的管状蠕虫及大型蛤类相似（见 19.8 节）。因此，动物-细菌共生体使得原核细胞成为一步食物链的基础。

概念检查

甲烷营养菌是一类可以生活在没有 C- C 碳化合物的原核生物。一些甲基营养菌也是甲烷营养菌，能够利用甲烷。已知有两类甲烷营养菌，每一类都含有大量的结构和生化的特性。甲烷营养菌存在于水中、土壤和海底贝类的共生体中。

- ◆ 甲烷营养菌和甲基营养菌的区别是什么？
- ◆ Ⅰ型和Ⅱ型甲烷营养菌的不同特征是什么？
- ◆ 在什么样的动物中存在甲烷营养菌共生体，这些共生体的来源是什么？

12.7 假单胞菌属和假单胞菌

代表属：假单胞菌属（*Pseudomonas*）、伯克霍尔德氏菌属（*Burkholderia*）、发酵单胞菌属（*Zymomonas*）、黄单胞菌属（*Xanthomonas*）

这个类群所有的属都是直的或稍微弯曲的、化能有机营养型、好氧、杆状、极生鞭毛（图 12.17b）。主要的属是假单胞菌属、产液单胞菌属（*Commamonas*）、罗尔斯通氏菌属（*Ralstonia*）和伯克霍尔德氏菌属，将在本章讨论。其他的属包括黄单胞菌属、动胶菌属（*Zoogloea*）和葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）。黄单胞菌属是一种主要的植物病原菌，与大量致死的植物病害有关，菌落呈黄色。动胶菌属可通过形成的胞外纤维状多聚物来鉴别，这种多聚物可使细胞凝集成明显的絮凝物（这种微生物是活性污泥中的主要成分，见 28.2 节）。葡萄糖杆菌属能将糖或乙醇不完全氧化为酸，根据这点可以鉴别该属，正如可用将葡萄糖氧化为葡萄糖酸或乙醇氧化为乙酸的特点来鉴别其他细菌一样（该属与其他一些醋酸细菌将在 16.17 节简要介绍）。在系统遗传学上，不同属的假单胞菌分散于变形细菌中（表 12.1）。

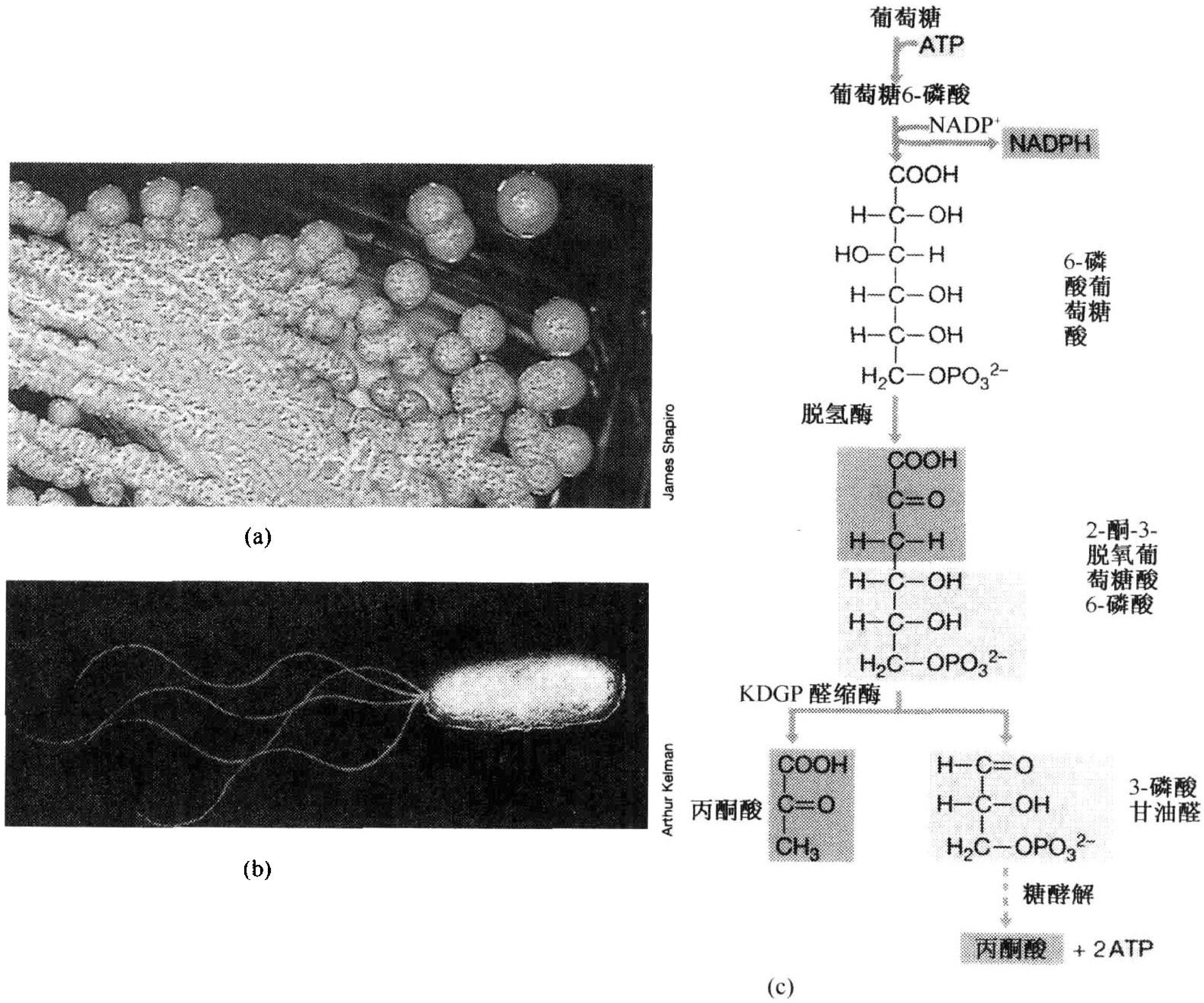


图 12.17 假单胞菌属（*Pseudomonas*）的典型菌落和细胞形态及常用的生化途径。（a）在琼脂平板生长的洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）。（b）一种假单胞菌的喷镀样品，细胞直径约 1μm。（c）ED 途径，是假单胞菌葡萄糖代谢的主要方法。

假单胞菌的特征

在表 12.9 中列出了用于区别假单胞菌（pseudomonad）类群的特征，表中还有一些细小的特征用于鉴定一种微生物是否为假单胞菌。关键的鉴别特征是：在葡萄糖中生长不产气，氧化酶反应为正，这两个特征有助于与肠道细菌相区别（见 12.11 节）。

表 12.9　假单胞菌的特征

共同特征
直的或弯曲的杆菌，无螺旋；大小为（0.5～4.0)μm×（1.5～4.0)μm；无芽孢；革兰氏阴性；极生鞭毛：一个或多个；无外鞘、附属物或芽；呼吸代谢机制，从不用发酵的形式，尽管在有氧条件下从葡萄糖可产生少量酸；利用低分子质量有机化合物，而不是多聚物；有些为无机化能营养型，利用 H_2 或 CO 作为唯一的电子供体；有些在无氧条件下利用硝酸盐为电子受体；有些可利用精氨酸为无氧条件下的能源
用于鉴别的细微特征
革兰氏阴性，直或微弯形；无芽孢；运动（通常），极生鞭毛（鞭毛染色）；以葡萄糖作为氧化发酵的基质：试管开口，产酸；试管封闭，不产酸；从葡萄糖中不产气（极易与大肠杆菌和好氧单胞菌相区分）；氧化酶通常为阳性（大肠杆菌为氧化酶阴性）；催化酶通常为阳性；缺少光合成色素（与紫色非硫细菌相区别）；吲哚试验阴性；甲基红试验阴性；V-P 试验阴性（关于这类生化反应的多种讨论，见 24.2 节）

假单胞菌属和相关的属中的种根据进化基础和生理特性的不同分类，如表 12.10 和表 12.11 所示。假单胞菌的营养需求简单，能够在中性 pH 下，中温温度范围内化能无机营养生长。

表 12.10　假单胞菌的亚群及特征

类群	系统进化类群[a]	特征	DNA/（mol%GC）
荧光亚群	γ	多数产生水溶性黄绿荧光色素；不形成聚-β-羟丁酸；单一 DNA 的同源性类群	
铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）		产绿脓素；可在大于 43℃下生长；单极生鞭毛；有反硝化作用	67
荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）		不产绿脓素或不在大于 43℃下生长；丛极生鞭毛	59～61
恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）		类似于荧光假单胞菌，但不液化明胶，利用苄胺生长	60～63
丁香假单胞菌（*Pseudomonas Syringae*）		缺乏精氨酸二氢水解酶；氧化酶阴性；对植物有致病性	58～60
施氏假单胞菌（*Pseudomonas stutzeri*）		土壤腐生菌；强固氮菌，不产荧光色素	62
食酸亚群	β	无色素；形成聚-β-羟丁酸；丛极生鞭毛；不利用碳水化合物；单一 DNA 的同源性类群	
食酸丛毛单胞菌（*Commamonas acidovorans*）		以己二烯二酸为单一碳源和电子供体	67
睾丸酮丛毛单胞菌（*Commamonas testosteroni*）		以睾丸酮为唯一碳源	62

续表

类群	系统进化类群[a]	特征	DNA/（mol%GC）
类鼻疽-洋葱亚群	β	无荧光色素；丛极生鞭毛；形成聚-β-羟丁酸；单一DNA的同源性类群	
洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）		极端营养多样性，某些菌株对植物有致病性	67
类鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia pseudomallei*）		引起动物的类鼻疽病；营养多样性	69
鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia mallei*）		引起动物鼻疽病；不运动；营养受限制	69
缺陷-泡囊亚群	α	具有短波长的单鞭毛；需维生素（泛酸盐、生物素、B_{12}）	
缺陷短波毛单胞菌（*Brevundimonas diminuta*）		不产色素，不利用糖类	66～67
泡囊短波毛单胞菌（*Brevundimonas vesiculais*）		产生类胡萝卜素，利用糖类	66
劳尔氏亚群	β		
青枯病劳尔氏菌（*Ralstonia solanacearum*）		植物病原菌	
嗜糖劳尔氏菌（*Ralstonia saccharophila*）		用 H_2 进行无机化能营养生长；可消化淀粉	69
嗜麦芽寡养单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）		需蛋氨酸；不利用 NO_3^- 作为N源；氧化酶阴性	67

a. 所有假单胞菌均为变形细菌（表12.1）。

假单胞菌中的许多种又一个显著的特征就是：能够利用广泛的有机物作为碳源和能源。一些种能够利用100多种不同的化合物，只有少数种少于20种。如洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）能够利用许多不同的糖、脂肪酸、二元酸、三元酸、乙醇、多醇、甘油、芳香烃化合物、氨基酸和胺，以及其他复杂的有机物。另一方面，假单胞菌通常缺少水解酶而不能将多聚物水解成单体。这些假单胞菌含有大量可诱导的操纵子（见8.5节），因为不同有机物的代谢通常需要不同酶的催化。

另一方面，假单胞菌通常因缺乏必要的水解酶，而不能把多聚物分解为单质。这些营养多样性的假单胞菌包含许多可诱导的操纵子（见8.5节），这是因为不寻常的有机底物的分解代谢通常需要许多不同酶的作用。

假单胞菌在生态学上是土壤和水体中非常重要的微生物，它可能负责降解有氧环境中动植物腐败而衍生的许多可溶性化合物。它们还能够降解许多异生型物质（非自然产生的）化合物，如杀虫剂及其他有毒的化学药品，对于环境的修复非常重要。

许多假单胞菌像其他的革兰氏阴性菌一样，通过ED途径（Enter-Doudoroff pathway）代谢葡萄糖（图12.17c）。ED途径的两个关键酶是6-P-葡萄糖脱氢酶和2-酮-3-脱氧葡萄糖酸醛缩酶（图12.17c）。对这两个酶在各种细菌中的调查表明，所有的革兰氏阳性菌中都没有（除了一些诺卡氏菌），而这两个酶却普遍存在于假单胞菌属（*Pseudomonas*）、根瘤菌属（*Rhizobium*）、农杆菌属（*Agrobacterium*）和发酵单胞菌属（*Zymomonas*）中，以及其他几个革兰氏阴性菌属中。

致病性假单胞菌

许多假单胞菌是致病性的（表 12.11）。在产荧光的假单胞菌属中，铜绿假单胞菌常与人类泌尿器官和呼吸道的感染有关。铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的感染在接受烧伤或者皮肤外伤治疗的患者中，以及遭受囊肿性纤维化的人群中很普遍（见 31.7 节）。铜绿假单胞菌不是一种专性寄生物。相反，这是一种随机感染的生物，它感染抵抗力低下的个体。除了泌尿系统的感染之外，它还可以引起全身的感染，通常是在有大范围皮肤损伤经历的个体中发生。

表 12.11　致病性假单胞菌

种	与疾病的关系
动物病原菌	
铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）	机会致病菌，尤其是在医院里；存在于患有代谢的、血液的恶性疾病的患者中；病源感染主要来自导管插入术、气管炎、腰椎穿孔和静脉注射；存在于使用免疫抑制剂、皮质类固醇、抗生素和进行长效辐射治疗的患者中；可能感染由于使用抗生素治疗的手术伤口、脓肿、烧伤、耳部感染、肺炎的患者；囊性纤维化疾病；主要是一种土壤微生物
荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）	很少致病，因为在 37℃下生长较差；可能生长于或冷藏污染的血液及血液制品
嗜麦芽假单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）	一种普遍存在的、自由生活的微生物。是常见的医院病原菌
洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）	引起洋葱球茎腐烂；也可从人体和医疗环境中分离到
类鼻疽假单胞菌（*Burkholderia pseudomallei*）	引起类鼻疽病，一种在东南亚人和动物中传播的传染
鼻疽假单胞菌（*Burkholderia mallei*）	引起鼻疽病，一种马的疾病，有时也可传播给人类
施氏假单胞菌（*Pseudomonas stutzeri*）	经常可从人类和环境中分离到；可能在机体上营腐生生活
植物病原菌	
茄科罗尔斯通氏菌（*Ralstonia solanacearum*）	引起多种作物枯萎（如土豆、番茄、烟草、花生）
丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）	攻击植物，引起叶子黄化和坏死的腐斑；很少在土壤中发现自由生活的细菌
边缘假单胞菌（*Pseudomonas marginalis*）	引起各种植物的软腐病；活跃分解果胶的菌种
野油菜黄单胞菌（*Xanthomonas campestris*）	引起叶子、茎、果实的坏死腐斑；也可引起枯萎和组织腐烂；很少在土壤中自由生活

铜绿假单胞菌对广泛应用的抗生素具有天然的抗性，所以化学疗法通常是困难的。抗性是由于有一个抗性转移质粒（R-plasmid）（见 10.9 节和 20.12 节），这个质粒携带有编码对各种抗生素有毒害的蛋白质的基因。铜绿假单胞菌通常是在医院环境里发现的，而且能够轻易地感染接受其他疾病治疗的患者（见 25.7 节）。多黏菌素（一种抗生素）由于其毒性而不常用来治疗人类疾病，但是它能有效地抵抗铜绿假单胞菌，并能在特定的药物条件下使用。

铜绿假单胞菌、罗尔斯通氏菌属（*Ralstonia*）、伯克霍尔德氏菌属（*Burkholderia*）和黄单胞菌属（*Xanthomonas*）的某些特定的种是众所周知的植物病原菌（phytopathogen）（表 12.11）。在许多情况下，这些微生物非常适应植物体环境，很少能从其他的生境中分离到，包括土壤。植物病原菌通常是寄生于非寄主植物上（疾病症状不明显），并且从它开始转移到寄主植物上发生感染。疾病的症状依病原菌的特异性和寄主植物的不同而变化。病原菌是通过释放植物毒素、裂解酶、植物生长因子和其他一些物质而造成植物组织的损伤或扭曲。在许多情况下，疾病的症状可以帮助判断植物病原菌的类型。因此，丁香假单胞菌（*P. syringae*）经常可以从有褐变腐斑的叶子上分离，而边缘假单胞菌（*P. marginalis*）是典型的"软腐"病病原菌，感染植物的茎和芽，很少感染叶子。

发酵单胞菌属

发酵单胞菌属（*Zymomonas*）由一大类革兰氏阴性杆状菌组成，能够进行活跃的发酵作用，将糖变成乙醇。尽管有很强的发酵能力，但是发酵单胞菌属在系统发生上表现出是从属于假单胞菌的，而且是利用 ED 途径进行糖发酵（图 12.17c）。

发酵单胞菌是一种常见的微生物，它在美国南部和中部、非洲及亚洲的许多热带地区的植物体液中进行乙醇发酵，它与酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）一样在南美和欧洲的饮料发酵工业中占据了重要的位置。例如，在墨西哥，利用发酵单胞菌对龙舌兰属植物进行乙醇发酵生产饮料龙舌兰酒，在许多其他热带地区利用发酵单胞菌对棕榈液进行发酵。它还能发酵甘蔗汁液和蜂蜜产生乙醇。尽管在这些发酵中并不只有发酵单胞菌这一种微生物起作用，但是它通常是处于支配地位，它可能是负责这些饮料中大部分乙醇的生产。发酵单胞菌还与果汁如苹果酒和梨酒的腐败有关，而且是使啤酒变质的菌群的重要组成部分。

发酵单胞菌与假单胞菌的区别主要在于它的发酵代谢、从微需氧到厌氧、氧化酶阴性及其他分子分类学特性。它与醋酸菌很相似（见 12.8 节），在自然界中它们通常是和醋酸菌联合在一起的。这是很有意义的，因为像酵母菌一样，发酵单胞菌发酵葡萄糖产生乙醇，而醋酸菌氧化乙醇生成醋酸。这样，醋酸菌依赖于酵母菌和发酵单胞菌的活动而获得它们生长的底物。

12.8 醋酸细菌

代表属：醋杆菌属（*Acetobacter*）、葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）

与其定义的来源一样，醋酸细菌（acetic acid bacterium）是一类革兰氏阴性，好氧的运动杆菌，它可以对乙醇和糖进行不完全氧化，使有机酸作为终产物而积累下来。以乙醇为底物，产生乙酸，这就是此类细菌名称的来源。

醋酸细菌对酸性环境具有相对较高的耐受性；大部分菌株能够在 pH<5 的环境中生长得很好。这种对酸的耐受性，是微生物产生大量有机酸所必需的。醋酸细菌是一类来源不同的细菌的集合，主要由周身鞭毛菌和极生鞭毛菌组成。极生鞭毛菌属于葡糖杆菌属，而周生鞭毛菌被划分到醋杆菌属。所有已知的醋酸细菌在系统发育学上属于 α 变形细菌（表 12.1）。

除了鞭毛外，醋杆菌属区别于葡糖杆菌属的是，它能够进一步氧化醋酸生成 CO_2。这种醋酸氧化能力的区别是与一个完整的柠檬酸循环的存在相关的。葡糖杆菌属缺乏这个完整的柠檬酸循环，所以不能氧化醋酸，而醋杆菌属拥有这个循环中所有的酶，所以能够氧化醋酸。

生态学和工业上的应用

醋酸细菌经常在含有乙醇的果汁中被发现。醋酸细菌通常是从含有乙醇的果汁如烈性苹果酒或者啤酒中分离到。醋酸细菌的菌落能从含有乙醇的 $CaCO_3$ 琼脂平板上鉴别出来，因为它产生的醋酸引起 $CaCO_3$ 的溶解而变得清晰（图 12.18）。醋酸菌的培养在工业上用于醋的生产（见 30.11 节）。

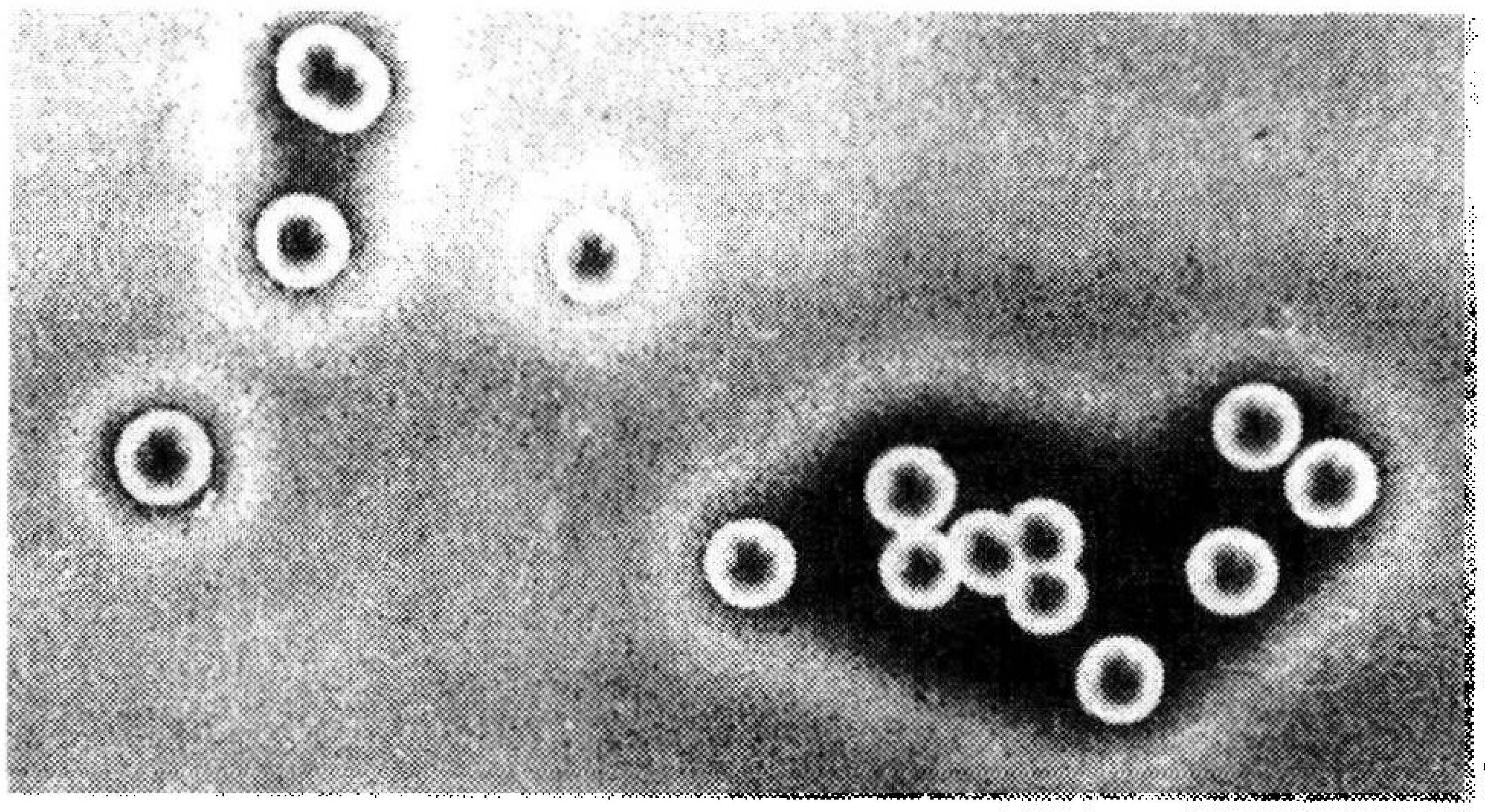


图 12.18　在含有乙醇为能源的碳酸钙琼脂上酸化醋杆菌（*Acetobacter aceti*）菌落的光学照片。注意由于细菌所产生的乙酸溶解 $CaCO_3$，形成围绕在菌落周围清晰的圈。

除了乙醇外，这类微生物也可以对一些有机化合物如更高级的醇和糖进行不完全氧化。如葡萄糖仅被氧化成葡萄糖酸、半乳糖被氧化为半乳糖酸、阿拉伯糖被氧化为阿拉伯糖酸等。这种“氧化不足”的性质被用于抗坏血酸（Vc）的工业生产。抗坏血酸可由山梨糖产生，但山梨糖难以用化学方法合成，却可通过醋酸菌很容易的得到。这些细菌可以把山梨醇（一种很容易得到的糖醇）仅仅氧化到山梨糖，这个过程叫做生物转化（biotrans formation）（见 30.8 节）。

有些醋酸菌还有另外一种有趣的性能，就是可以合成纤维素（cellulose）。合成的纤维素与植物纤维素没有显著的不同，它是纯的纤维素而不像植物的半纤维素、胶质或者木质素那样与其他聚合体混在一起。醋酸菌产生的纤维素在细胞壁外形成一个网，使细胞包埋在大量的交织微纤维中。当这些种的醋酸细菌在静止容器中生长时，它们在生长的过程中形成一层纤维素表面薄膜。由于这些细菌是专性需氧的，形成菌膜的能力可能是为了保证微生物能够更容易地利用液体表面的氧气。

12.9　自由生活的需氧固氮菌

代表属：固氮菌属（*Azotobacter*）、氮单胞菌属（*Azomonas*）

多种生活在土壤中的微生物在有氧条件下都能固氮（表 12.12）。固氮菌属（*Azotobacter*）是一大类革兰氏阴性、专性需氧的杆菌，在非共生条件下能够固氮（图 12.19）。其中第一个菌株是由荷兰微生物学家 Martinus Beijerinck 在 20 世纪早期发现的（见 1.7 节）。他利用了需氧增殖培养技术，使用了含有 N_2（空气）但是无合成氮源的培养基（见 18.1 节和图 18.1）。在系统发生上，大部分自由生活固氮菌属于 α、β，或者 γ 变形细菌（表 12.12）。

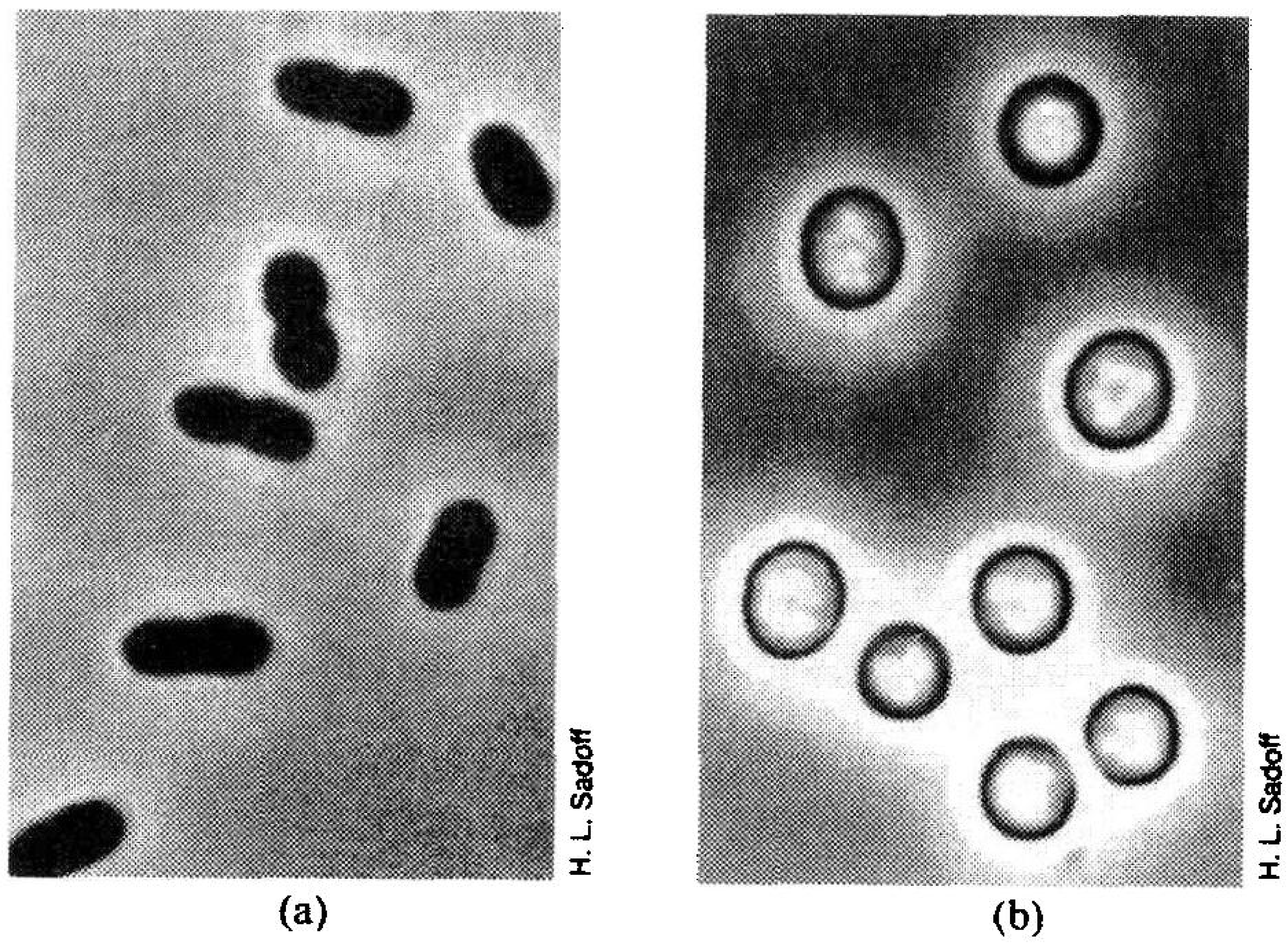


图 12.19 棕色固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）。（a）营养细胞和。（b）胞囊相差显微照片：细胞直径约为 2μm，胞囊约为 3μm。与图 1.14 相对比。

表 12.12 自由生活需氧固氮菌属

特征	属	DNA/（mol%GC）
γ 变形细菌		
大型杆菌；产生胞囊；主要在中性到碱性土壤中被发现	固氮菌属（*Azotobacter*）	63～67
大型杆菌；无胞囊；主要水生	氮单胞菌属（*Azomonas*）	52～59
α 变形细菌		
微需氧杆菌；与植物相关联	固氮螺菌属（*Azospirillum*）	69～71
珍珠状杆菌，在每个末端具有大的脂质体；产生大量黏液；生存于酸性土壤	拜叶林克氏菌（*Beijerinckia*）	54～59
杆菌；形成粗糙的、褶皱的菌落	德克斯氏菌属（*Derxia*）	69～37
β 变形细菌		
小型弯曲细胞；无胞囊	固氮弧菌属（*Azoarcus*）	65
极细弯曲细胞；无胞囊	固氮弧菌属（*Azovibrio* ）	64～65
极细杆菌到弧菌；无胞囊	固氮螺旋菌属（*Azospira*）65～66	
细胞形成卷状，长达 50μm，无胞囊	*Azonexus*	65～66

分类学

已经研究了包括固氮菌属、固氮螺菌属（*Azospirillum*）及拜叶林克氏菌属（*Beijerinckia*）在内的自由生活固氮菌。固氮菌属的细胞很大，许多单独的细胞几乎有酵母那么大，直径为 2～4μm 或者更大。多型性现象很普遍，细胞形状和大小的多样性已经被描述过了。一些菌株能通过周生鞭毛运动。在含有糖类的培养基上，自由生活固氮菌能产生大量的荚膜或者黏液层（图 12.20，见 17.71 节）。

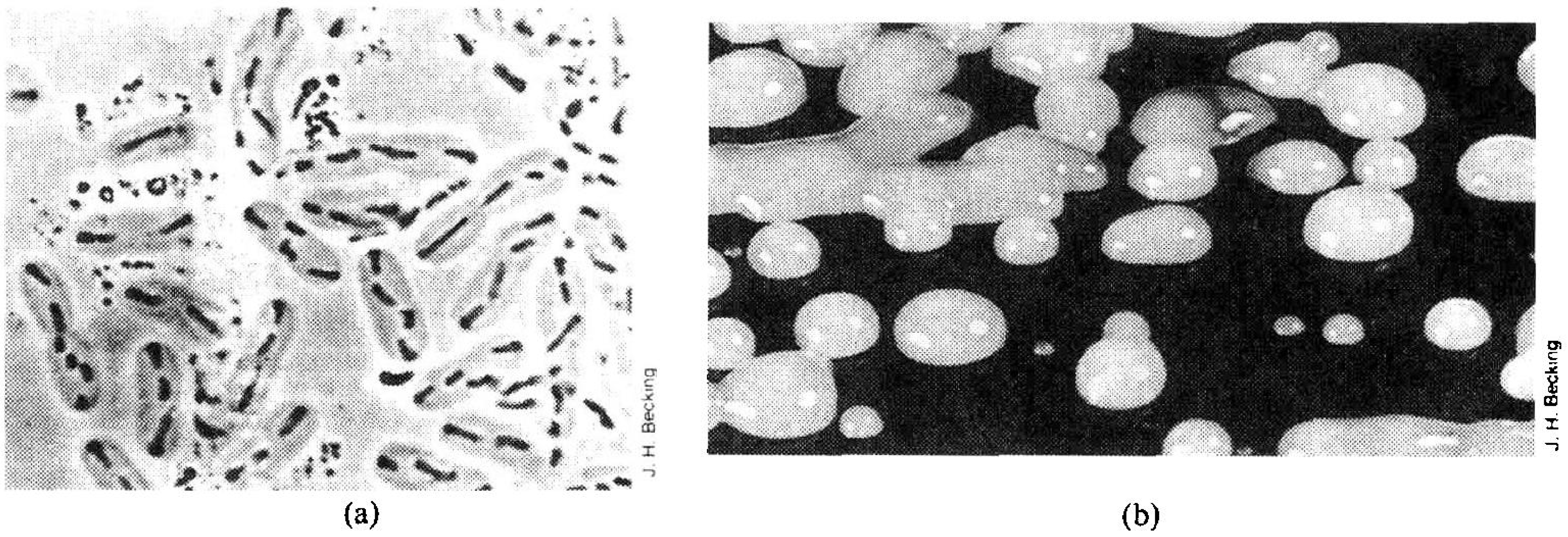


图 12.20 由自由生活固氮菌产生黏液的例子。（a）胶德克斯氏菌（*Derxia gummosa*）陷于黏液中的细胞。细胞宽 1～1.2μm。（b）生长于含有碳水化合物培养基上的拜叶林克氏菌属（*Beijerinckia*）的菌落。注意因为有大量的荚膜黏质而形成的突起、黏滑的外表。

尽管固氮菌是专性需氧菌，它的固氮酶（催化生物固氮）却对 O_2 是敏感的。人们认为，固氮菌高呼吸效率的特性及产生大量荚膜黏液与保护固氮酶不与 O_2 接触有关。固氮菌能够利用很广泛的底物生长，如糖类、醇类及有机酸。碳素化合物的代谢是严格氧化的，几乎不产生酸或者其他发酵产物。这个属所有的成员都固氮，但是也可以利用简单形式的结合氮生长，如氨、尿素和硝酸盐。

固氮菌能够形成一种休眠结构称为胞囊（cyst）。就像细菌芽孢一样，固氮菌胞囊（图 12.19b）表现出微弱的内源呼吸及能耐受干燥、机械破坏、紫外和电离辐射的能力。然而和芽孢相比，胞囊并不是很耐热，它们不是完全处于休眠状态的，因为它们能快速氧化外部能源。

现存自由生活的固氮菌还包括：氮单胞菌属，它是一种大的杆状细菌，除了它们不产生胞囊及主要水生之外，其他特性类似于固氮菌；而拜叶林克氏菌属（图 12.20b）和德克斯氏菌属（*Derxia*）（图 12.21），这两个属的细菌能够很好地生长在酸性土壤。固氮螺菌是一种杆状到螺旋状固氮菌，与各种植物形成非特异的共生关系，特别是玉米（图 12.12），是典型代表。

固氮菌与可变固氮酶

我们在 17.28 节学习生物固氮的重要过程。在那里我们将了解到金属钼（Mo）和铁（Fe）对固氮酶的中枢作用。褐球固氮菌（*Azotobacter chroococcum*）是第一种在无钼固氮酶中生长的固氮菌。在褐球固氮菌中，第一个被发现在一定的生长环境下（当不存在钼时），会形成两个“可变固氮酶”：含有钒（V）加铁（Fe）或者只有铁，以此来

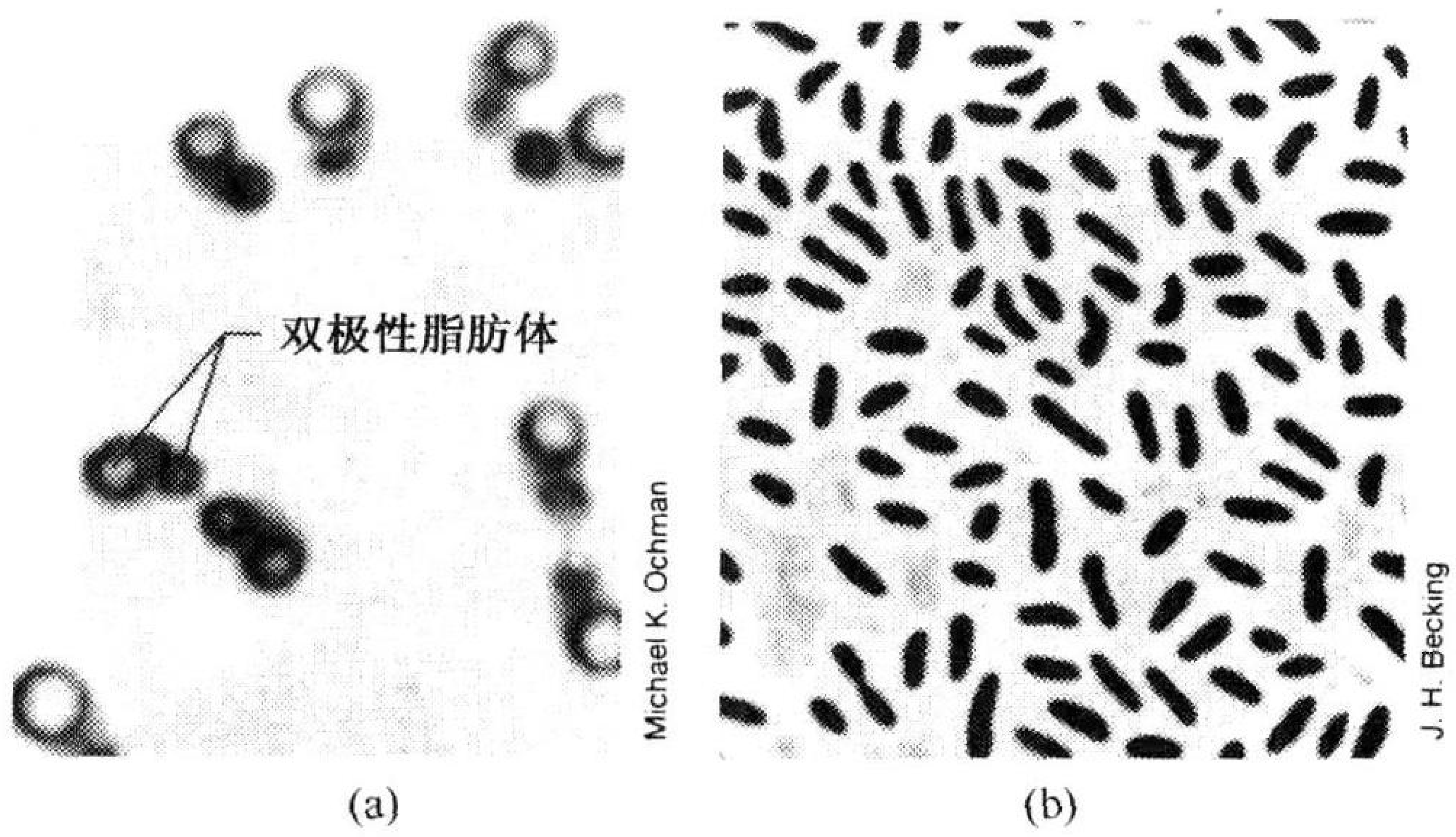


图 12.21 两个属的耐酸自由生活固氮菌的相差显微照片。 (a) 印度拜叶林克氏菌 (*Beijerinckia india*)。细胞为粗糙的圆梨形，直径约为 0.8μm，细胞含有一个多聚β-羟丁酸的大的球状物 (见 4.11 节)。(b) 胶得克斯氏菌 (*Derxia gummosa*)。细胞直径约为 1μm。

代替钼固氮酶。后来对其他固氮菌的研究表明，这种“候补”固氮酶系统是广泛分布于固氮菌中的，包括古生菌 (*Archaea*)，其中有少数种能够固氮。

概念检查

假单胞菌属包括许多革兰氏阴性、化能异养好氧杆菌；许多固氮菌的种类在系统发生上是紧密相关的。醋酸细菌与假单胞菌在系统发生上也是相关的，且可通过氧化乙醇为乙酸的能力来鉴别。

◆ 比较假单胞菌、固氮菌和醋酸菌在氧气的需求、电子供体、致病性和生境上的异同。

◆ 从你能够想出的各个方面比较醋杆菌与醋酸细菌的异同。

12.10 奈瑟氏球菌属、色杆菌属及相关菌属

代表属：奈瑟氏球菌属 (*Neisseria*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*)

β和γ变形细菌的这个组包括种类繁多的菌株，它们通过很多特性联系在一起，主要有系统发生、革兰氏染色、形态学特征、缺乏运动能力、需氧代谢等。奈瑟氏球菌属、莫拉氏菌属 (*Moraxella*)、布兰汉氏球菌属 (*Branhamella*)、金氏菌属 (*Kingella*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的区别列在表 12.13 中。

在奈瑟氏球菌属中，细胞一般是球形 (图 12.22a 和图 26.28)，而其他属的细胞是杆状的，只有生长到稳定期才变为球形。根据这一特征，我们称这些微生物为球杆菌 (coccobacillus)。奈瑟氏球菌属、金氏菌属和莫拉氏菌属这几个属的微生物通常可以从动物中分离，其中一些菌株是致病性的。在 24.1 节及 26.12 节我们分别论述了淋病的致病因子淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和淋病的临床微生物学。

表 12.13　革兰氏阴性球菌属的特征[a]

特征	属	DNA/(mol%GC)
Ⅰ. 氧化酶阳性，青霉素敏感		
球菌；复合营养，利用糖类，专性好氧菌；β变形细菌或者γ变形细菌	奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）	(49～55)
杆菌或球菌：一般不需要生长因子，通常不利用糖类；没有鞭毛，但是一些种可进行颤动运动；许多种是动物的共生体或病原体；β变形细菌	莫拉氏菌属（*Moraxella*）	(40～46)
	布兰汉氏球菌属（*Branhamella*）	(40～46)
	金氏菌属（*Kingella*）	(47～55)
Ⅱ. 氧化酶阴性，青霉素抗性		
一些菌株可利用种类有限的糖类，一些菌株可进行颤动运动	不动杆菌属（*Acinetobacter*）	(38～47)

a. 全部都是变形细菌。

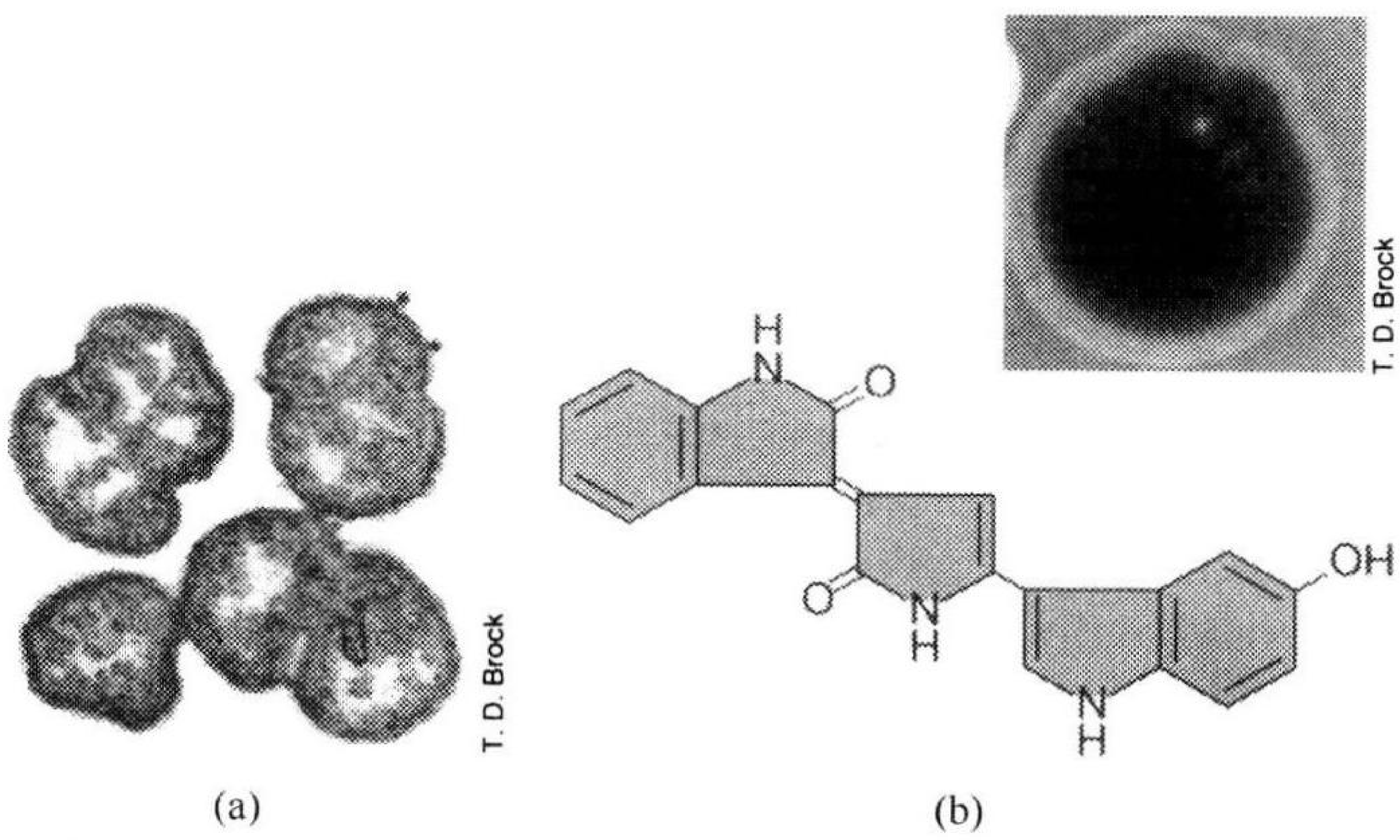


图 12.22　奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）和色杆菌属（*Chromobacterium*）。（a）淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）细胞的透射电镜照片，显示了典型的双球菌细胞排列。（b）紫色色杆菌（*Chromobacterium violaceum*）的一个大菌落。紫色素是一种芳香族化合物称为紫色杆菌素。

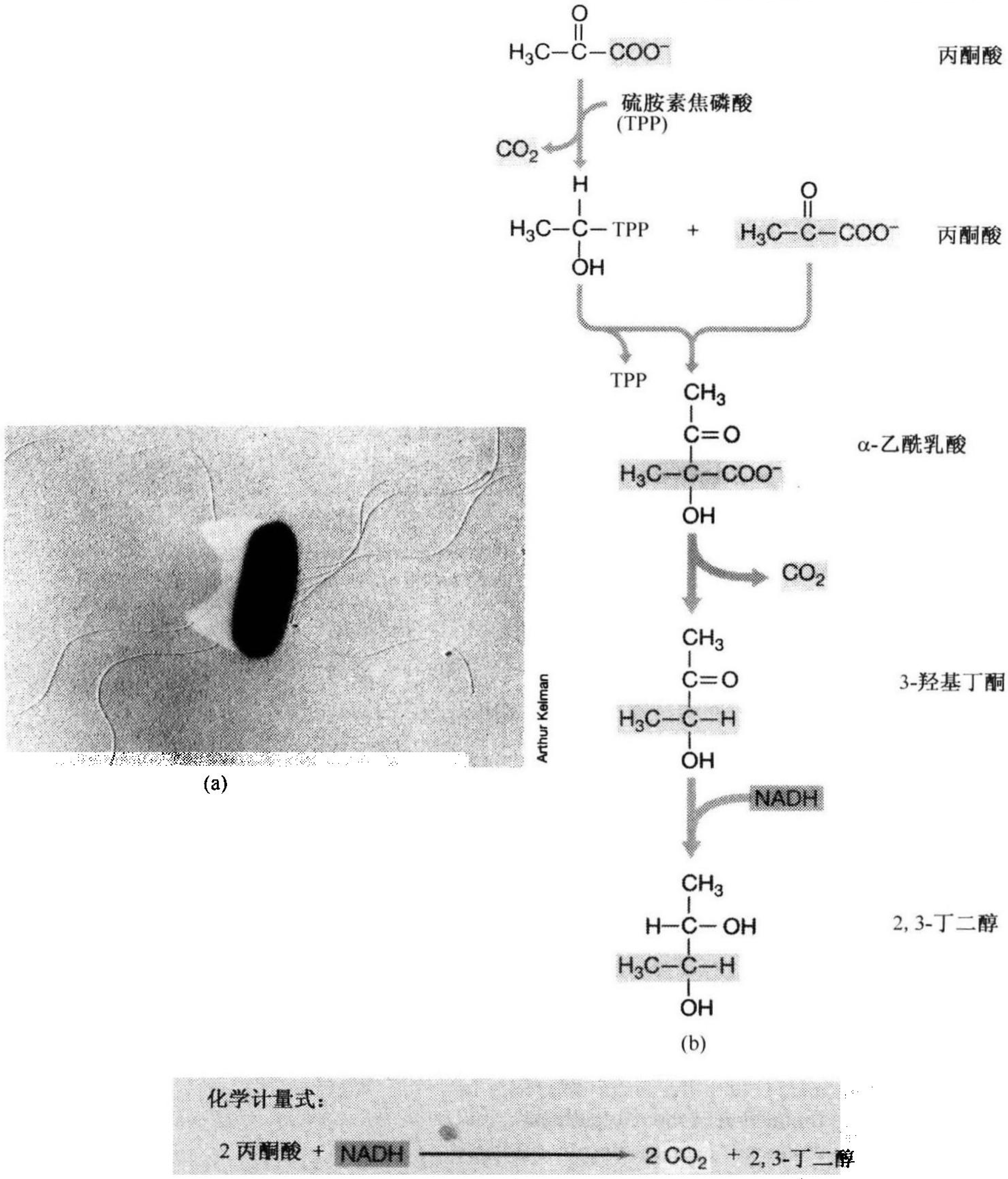
不动杆菌属（*Acinetobacter*）是普通的土壤和水体微生物，有时也可发现它们寄生于动物体并与医院内感染有关。莫拉氏菌属和不动杆菌属的一些菌株具有一种有趣的特征叫颤动，表现为短促的位移或者距离 1～5μm 的“跳动”。颤动微生物具有特殊的菌毛（见 4.10 节）以利于运动过程。

色杆菌属是一类与奈瑟氏菌属致病性相似，但是在形态上是杆状，类似于假单胞菌或者肠细菌。最有名的色杆菌是紫色色杆菌（*Chromobacterium violaceum*），它是一种紫色的微生物（图 12.22b），可以从土壤、水中及偶尔从人或动物化脓性的感染部位分离到。紫色色杆菌和一些其他的色杆菌产生紫色色素——紫色杆菌素（violacein）（图 12.22b），这是一种水不溶性色素，有类似抗生素的性质，只能在含有色氨酸的培养基上才能产生。像肠细菌一样，色杆菌是兼性好氧菌，可以发酵糖来生长也可利用多种碳源进行需氧生长。

12.11 肠细菌

代表属：埃希氏菌属（*Escherichia*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、变形菌属（*Proteus*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）

肠细菌（enteric bacterium）包括了γ变形细菌中相对均一的一个系统发育类群，它们的表型特征有：革兰氏阴性、不产芽孢的杆菌，不游动或以周生鞭毛运动（图12.23a）、兼性好氧、氧化酶反应阴性并且对营养的要求相对较低、发酵蔗糖产生多种



(c)

图 12.23　丁二醇产生。（a）产丁二醇的肠细菌，胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora*）的细胞喷涂样品电镜照片，细胞大约宽 0.8μm。请注意细胞的周生鞭毛（见 4.14 节）。（b）丁二醇发酵菌利用 2 分子丙酮酸生成丁二醇的生化反应途径。（c）总化学计量式（overall stoichiometry）。注意是如何利用 2 分子丙酮酸却只有 1 分子的 NADH 来生成丁二醇的。

终产物。在表 12.14 中列出了用于对肠细菌和其他具有相似形态和生理特征的一些细菌进行区分的表型特征。

表 12.14　肠细菌的鉴定特征

一般特征
革兰氏阴性直杆状；以周生鞭毛游动或不游动；不形成芽孢；兼性好氧，利用葡萄糖产酸；既不需要钠盐也不刺激产生；过氧化氢反应阳性；氧化酶反应阴性；一般降解硝酸盐为亚硝酸盐（而不是 N_2）；具有紫色细菌（Proteobacteria）16S rRNA 的 γ 部分（表 12.1）
区别肠细菌与其他相似形态细菌的特征反应
肠细菌的氧化酶反应呈阴性，区别于其他具有相似形态的氧化酶反应阳性菌，如假单胞菌属（*Pseudomonas*）、气单胞菌属（*Aeromonas*）、弧菌属（*Vibrio*）、产碱杆菌属（*Alcaligenes*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）和心杆菌属（*Cardiobacterium*）；只把硝酸盐降解为亚硝酸盐（生长后进行亚硝酸盐试验），区别于其他将硝酸盐降解为 N_2 的细菌（产气检测），如假单胞菌和许多其他氧化酶反应阳性细菌；能够发酵葡萄糖，区别于其他专性好氧细菌

肠细菌中的许多菌株对人类、动物或植物具有致病性，同时许多菌株也是重要的工业生产菌，大肠杆菌（*Escherichia coli*）可能是其中最著名的了（见 10.19 节）。由于肠细菌具有重要的医药用途，它们得到了最大限度的分离和研究，目前已经确定了许多独立的属。通过 DNA 同源分析（见 11.11 节）和遗传重组已经证明，肠细菌中的许多菌株在遗传学上有明显的联系。但是很多独立的属被保留下来，这主要是为实际用途考虑，如临床微生物鉴定。由于肠细菌经常存在于许多病理条件下，所以为了满足快速治疗，一些鉴别它们的方法是非常必要的。因此，在区分肠细菌的不同属时表型特征通常很重要。

肠细菌的发酵形式

肠细菌对葡萄糖进行厌氧发酵的发酵产物具有不同的类型和比例，这是对肠细菌的不同属进行鉴别的一个关键分类特征，混合酸发酵和 2,3-丁二醇发酵是两个主要形式（图 12.24）。

在混合酸发酵（mixed-acid fermentation）中，大量产生三种酸——乙酸、乳酸和丁二酸，同时也生成乙醇、CO_2 和 H_2，但是没有丁二醇，在丁二醇发酵中也会产生较少量的酸，而其主要产物是丁二醇、乙醇、CO_2 和 H_2。混合酸发酵的结果是产生等量的 CO_2 和 H_2，而在丁二醇发酵中产生的 CO_2 比 H_2 要多。这是因为混合酸发酵只是通过甲酸脱氢酶系从甲酸生成 CO_2：

$$HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2$$

这一反应产生等量的 CO_2 和 H_2。丁二醇发酵也从甲酸生成 CO_2 和 H_2，但是在生成丁二醇的反应中会产生另外 2 分子 CO_2（图 12.23b）。

肠细菌的鉴定

多种鉴定试验和不同的培养基被用于鉴别两大发酵类型肠细菌的不同属（表 24.2 和表 24.3）。在这些方法和其他试验的基础上，我们可以确定肠细菌的属，参

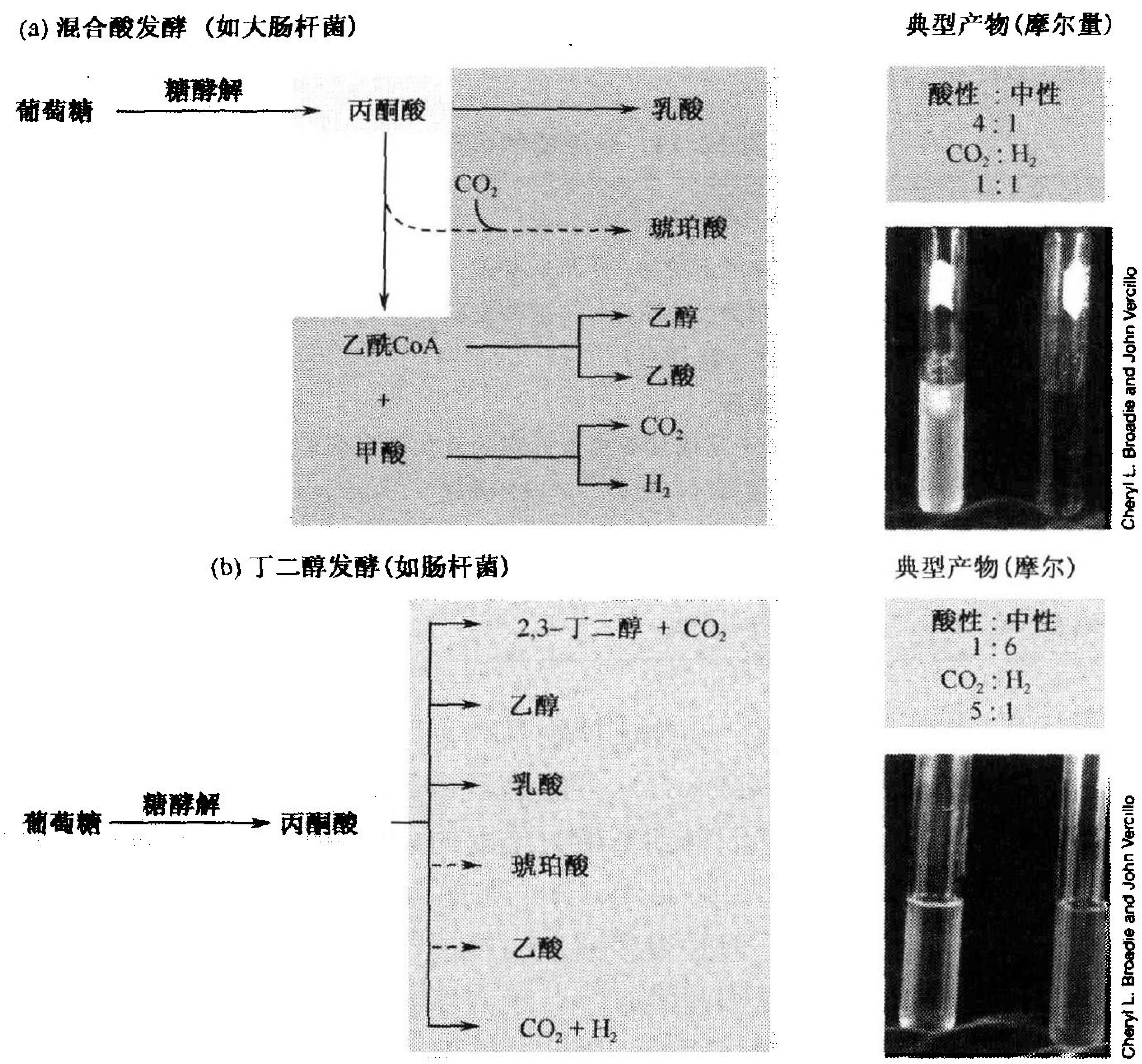


图 12.24　肠细菌发酵形式。(a) 混合酸发酵和 (b) 丁二醇发酵之间的区别。黑箭头表示产生主要产物的反应。虚线箭头表示次要产物的反应。上面的照片显示在 *E. coli*（紫色试管是未接菌的对照）的培养中产酸（黄色）和产气（在倒置的 Durham 试管中）的现象。下面的照片显示产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）培养之后在 VP 试验中呈粉红色，表明有丁二醇产生。左边的试管（黄色）为未接菌的对照。请注意两个途径中 CO_2 产生的主要的不同之处，在丁二醇产生途径中有更多的 CO_2 产生。这是因为 1 分子的丁二醇产生时消耗 2 分子丙酮酸却只消耗 1 分子的 NADH（图 12.23b、c 中的途径），在每个丁二醇产生过程中必须生成 0.5 分子的乙醇来消耗糖酵解中产生的第二个 NADH。

见表 12.15 和表 12.16。由于肠细菌在遗传上十分相近，在肠细菌的常规鉴别中经常会出现许多困难。在临床实验中，鉴定工作是通过计算机对大量的鉴定试验进行分析而开展的，这些反应使用微型快速检测试剂盒及免疫和核酸探针（图 24.1），利用菌株具有不同反应的特点作为基础进行，并且格外注意异常菌株的不同反应。另外，还可以利用分子生物学方法（见 24.5～24.12 节）。因此，必须认为在表 12.15 和表 12.16 中列出的属间分类是近似的，这是由于经常有可能会分离出一些菌株，它们并没有整个属共有的某个特性。针对这些限制，图 12.25 中介绍了一种更为简化的种属鉴别方法。这一方法可以对新分离出的菌株进行属的快速的近似鉴别。我们现在考虑代表属的一些性质。

表 12.15 分离肠细菌一些代表属的鉴定反应[a]

属	H_2S (TSI)	尿素	VP[b]	吲哚	运动性	利用葡萄糖产气[b]	β-半乳糖苷酶
埃希氏菌属（*Escherichia*）	−	−	−	+	+或−	+	+
肠杆菌属（*Enterobacter*）	−	−	+	−	+	+	+
志贺氏菌属（*Shigella*）	−	−	−	+或−	−	−	+或−
爱德华氏菌属（*Edwardsiella*）	+	−	−	+	+	+	−
沙门氏菌属（*Salmonella*）	+	−	−	−	+	+	+或−
克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）	−	+	+或−	−	−	+	+
柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）	+或−	−	−	−	+	+	+
变形菌属（*Proteus*）	+或−	+	−	+或−	+	+或−	−
普罗威登斯菌属（*Providencia*）	−	−	−	+	+	−	−
耶尔森氏菌属（*Yersinia*）	−	+	−	−	+[c]	−	+
哈夫尼菌属（*Hafnia*）	−	−	+	−	+	+	+或−

属	KCN	柠檬酸盐	黏酸盐利用	苯甲基红	酒石酸利用	丙氨酸脱氨酶	DNA/(mol%GC)
埃希氏菌属（*Escherichia*）	−	−	+	+	+	−	48～52
肠杆菌属（*Enterobacter*）	+	+	+	−	−	−	52～60
志贺氏菌属（*Shigella*）	−	−	−	+	−	−	50
爱德华氏菌属（*Edwardsiella*）	−	−	−	+或−	−	−	53～59
沙门氏菌属（*Salmonella*）	−	+或−	+或−	+	+或−	−	50～53
克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）	+	+	+	−	+或−	−	53～58
柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）	+或−	+	+	+	+	−	50～52
变形菌属（*Proteus*）	+	+或−	−	+	+	+	38～41
普罗威登斯菌属（*Providencia*）	+	+	−	+	+	+	39～42
耶尔森氏菌属（*Yersinia*）	−	−	−	+	−	−	46～50
哈夫尼菌属（*Hafnia*）	+	+	−	+	−	−	48～49

a. 这些反应的过程见表 24.1。
b. 这个反应的照片见图 12.24。
c. 室温时运动，在 37℃不运动。

表 12.16 分离不同属的 2，3-丁二醇发酵菌的主要鉴别反应[a]

属	鸟氨酸脱氢酶	明胶水解	最佳生长温度/℃	色素形成	运动性	乳糖	DNase	山梨糖醇	DNA/(mol%GC)
克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）	−	−	37～40	无	−	+	−	+	53～58
肠杆菌属（*Enterobacter*）	+	慢	37～40	黄（或无）	+	+	−	+	52～60
沙雷氏菌属（*Serratia*）	+	+	37～40	红（或无）	+	−	+	−	52～60
欧文氏菌属[b]（*Erwinia*）	−	+或−	27～30	黄（或无）	+	+或−	−	+	50～58
哈夫尼菌属（*Hafnia*）	+	−	35	无	+	−	−	−	48～49

a. 这些鉴别反应的描述见表 24.3。
b. 见图 12.23a。

诊断试验		跳至步骤
1	MR+; VP – (混合酸发酵菌)	2
	MR –; VP + (丁二醇发酵菌)	7
2	脲酶+	变形菌属
	脲酶–	3
3	H_2S (TSI) +	4
	H_2S (TSI) –	6
4	KCN +	柠檬酸杆菌属
	KCN –	5
5	吲哚 +; 柠檬酸 +	爱德华氏菌属
	吲哚 –; 柠檬酸 –	沙门氏菌属
6	葡萄糖产气	埃希氏菌属
	葡萄糖不产气	志贺氏菌属
7	不运动–	克雷伯氏菌属
	运动+	8
8	明胶水解+; DNA酶+	沙雷氏菌属 (红色素)
	明胶水解慢+; DNA酶–	肠杆菌属

关键

混合酸发酵菌（深色阴影）
丁二醇发酵菌（浅色阴影）

图 12.25 肠细菌代表属的简便鉴定方法。图中只列出了最常见的属。采用该方法时请参考试剂盒使用说明书上的警告。图中的鉴定试验在表 24.3 中已列出。这些属的其他特征列在表 12.14～表 12.16。颜色反应见图 12.24。

埃希氏菌属

埃希氏菌属（*Escherichia*）的成员广泛分布于人类和温血动物的肠道，但是它们在寄生地不一定是优势菌群。埃希氏菌属的菌株可以在肠道中合成维生素，特别是维生素 K，为寄主提供营养。作为兼性好氧菌，它们也会消耗氧气，这样可以帮助维持一个无氧的肠道环境。野生型的埃希氏菌属的菌株几乎不需要任何生长因子，可以在广泛的碳源、能源中生长，如蔗糖、氨基酸、有机酸等。

一些埃希氏菌属的细菌是病原性的。一些最近发现的菌株与新生儿的腹泻有关，这种情况在婴儿护理室和产房比较常见。另外由于老年人和一些外科手术后或受电离辐射的人的抵抗力较低，埃希氏菌也可能会引起这些人的尿道感染。大肠杆菌（*E. coli*）中的一些肠道病原菌越来越频繁地引起类似痢疾的感染和全身性高热（见 21.6 节、21.11 节和 29.8 节）。值得注意的是，一些菌株产生 K 抗原，可以促进其在小肠的吸附和生长，一些菌株则生成导致腹泻的肠毒素。

沙门氏菌属和志贺氏菌属

沙门氏菌属（*Salmonella*）和埃希氏菌属有着密切的联系，通过 DNA∶DNA 杂交证明两个属的 DNA 序列具有约 50%的同源性（见 11.11 节）。但是，与埃希氏菌属不同的是，沙门氏菌属的菌株对于人类或其他温血动物大多是致病性的。沙门氏菌属在人

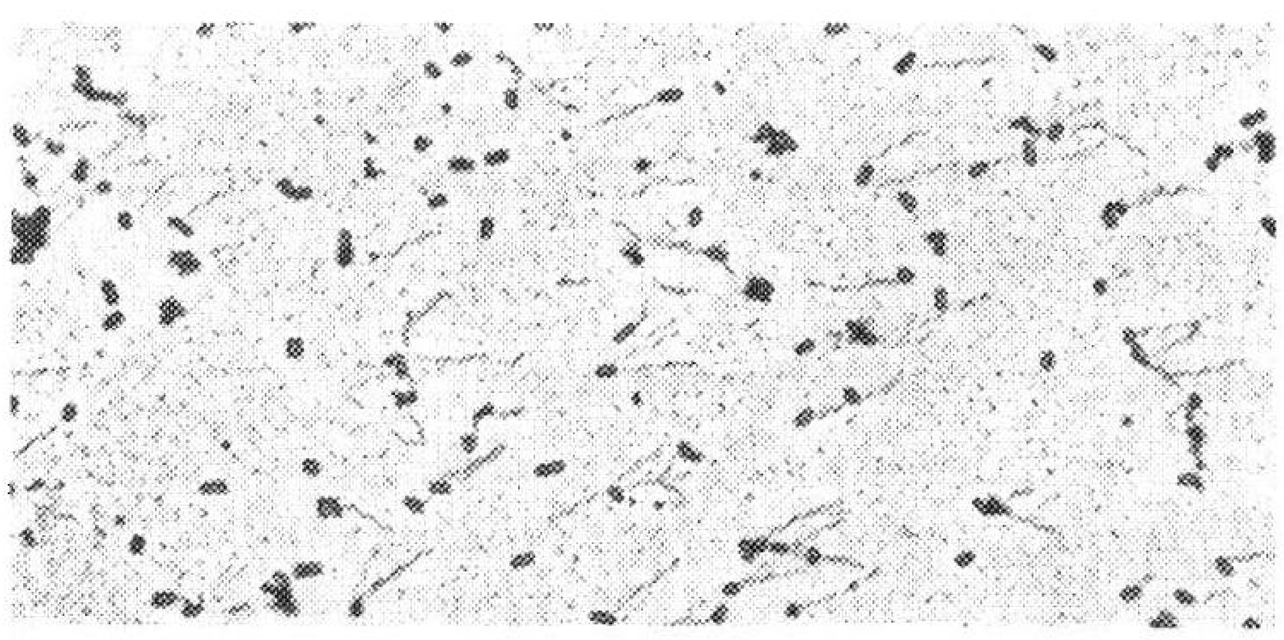
类中引起的疾病主要是伤寒和胃肠炎（见 28.8 节和 29.7 节）。沙门氏菌属的免疫特征是三种细胞表面抗原，分别是 O 抗原或称细胞壁（菌体）抗原、H 抗原或称鞭毛抗原，以及位于外多糖层的 Vi 抗原。其中 Vi 抗原最先发现于引起伤寒的沙门氏菌。

O 抗原是一种脂多糖复合物结构的一部分，这种脂多糖组成了沙门氏菌外膜最外层部分（见 4.9 节和 21.12 节）。我们在 4.9 节讨论了脂多糖的化学结构（图 4.35 和图 4.36）。整个沙门氏菌属包括 1000 多种不同的 O 抗原型。进一步再划分抗原亚型则是根据鞭毛（H）抗原的特异性。沙门氏菌的抗原性和引起疾病的症状并没有必然的联系，但是我们可以根据抗原型来确定与某种流行病有关的某个菌株。

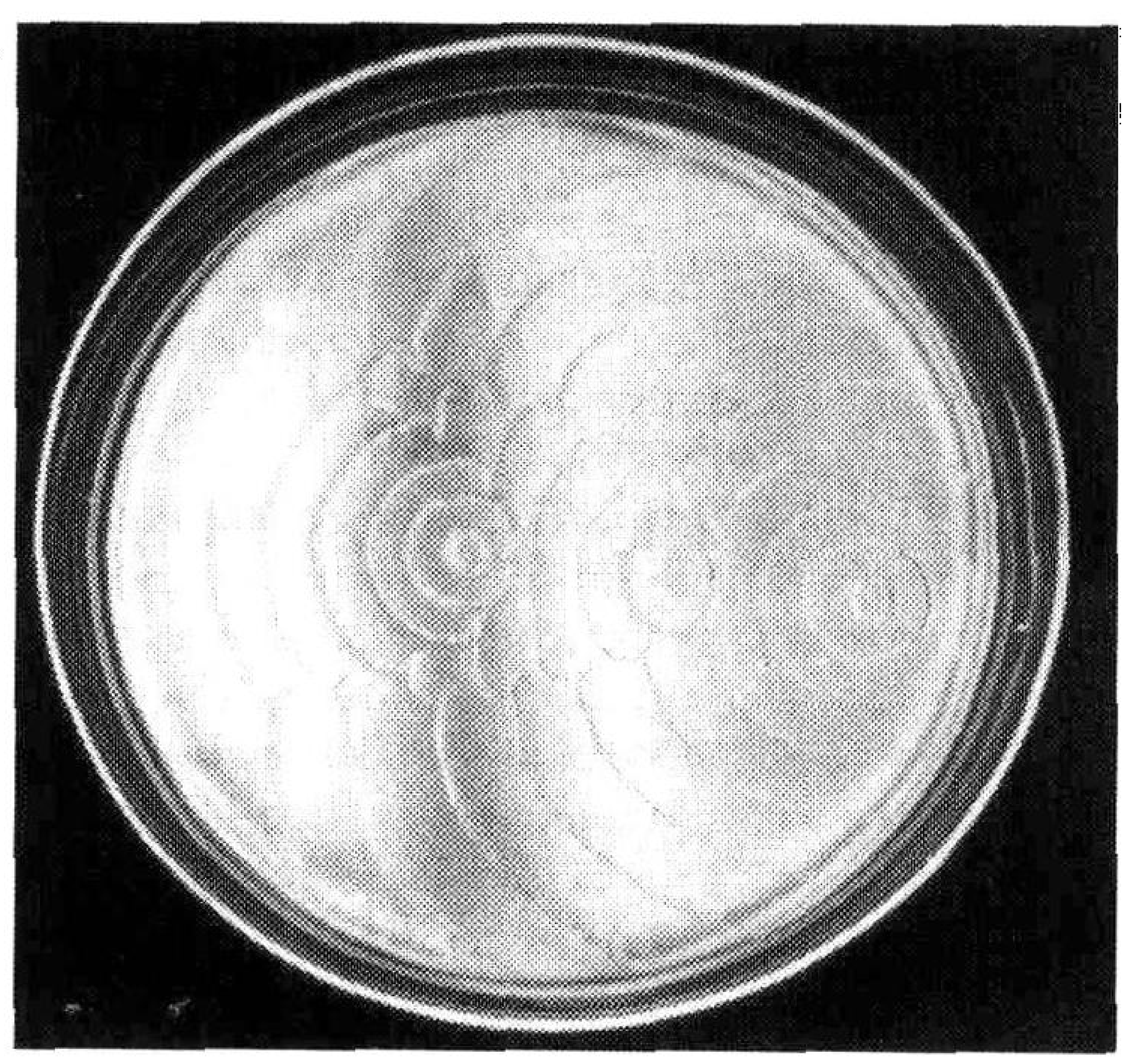
志贺氏菌属（*Shigella*）与埃希氏菌属也有着密切的联系。DNA 同源性的检测表明，志贺氏菌属与大肠杆菌具有 70%或者更高的同源性。但是，与埃希氏菌属不同的是，志贺氏杆菌属一般对人类具有病原性，引起一种相当严重的胃肠炎叫做细菌性痢疾（*bacillary dysentery*）。痢疾志贺氏菌（*Shigella dysenteriae*）是通过食物和水传播的，这种细菌可以侵入肠道上皮细胞（见 29.11 节），一旦进入，它会产生内毒素和一种表现为肠毒素作用的神经毒素。

变形菌属

变形菌属（*Proteus*）的特征是可以进行快速的运动（图 12.26），并能够产生脲酶。从 DNA 同源性来看，它与大肠杆菌关系较远。变形菌是引起人类尿道感染的主要原因，少数时候也会引发肠炎。变形菌属的菌株具有分解尿素的能力，因此可以在多种肾脏感染疾病中发现它们的存在。变形菌的细胞可以快速的运动，因此在琼脂平板上生长的菌落常常会呈现一种特征性的群游（swarming）现象（图 12.26b）。生长在菌落边缘的细胞比菌落中央的细胞运动更快；前者运动离开菌落一小段距离后会减慢运动速度，然后固定下来分裂，形成一个新的充满运动细胞的菌群。这样，自然生长的变形菌菌落呈一系列的同心圆环状，高细胞浓度和低细胞浓度交替排列（图 12.26b）。



(a)



(b)

图 12.26　变形菌属的群游现象。（a）奇异变形菌（*Proteus mirabilis*）细胞的鞭毛染色照片：每个细胞的周生鞭毛都聚集成了一束。（b）普通变形菌（*Proteus vulgaris*）的群游菌落照片。请注意这些同心圆环。

丁二醇发酵：肠杆菌属、克雷伯氏杆菌属、沙雷氏菌属

各种丁二醇发酵菌之间的联系比其与混合酸发酵菌的联系要紧密得多，这与它们在生理上的差别是一致的。丁二醇发酵菌的 DNA 碱基组成的 GC 含量高达 53%～58%，表 12.16 列出了这一类菌的分类特征。

产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）通常存在于水、污水及温血动物的肠道中，偶尔也是引起尿道感染的病原。一种克雷伯氏杆菌——肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*），会引起人类的肺炎，但是克雷伯氏杆菌在土壤和水中并不常见。大多数克雷伯氏菌属的菌株可以固氮（见 17.28 节），这一性质在其他肠杆菌中还没有发现。

沙雷氏菌属（*Serratia*）能形成一系列称为灵菌红素（prodigiosin）的红色色素（图 12.27）。灵菌红素是在菌体生长的稳定期作为次生代谢产物产生的（见 30.2 节），有趣的是它含有一种吡咯环结构，而这种吡咯环结构也存在于参与能量传递的色素中，如卟啉、叶绿素和藻胆素（见 17.2 节和 17.3 节）。但是目前还没有证据证明灵菌红素在能量传递中起到任何作用，它的确切功能还不清楚。沙雷氏菌不但可以从水和土壤中分离得到，还可以从昆虫、脊椎动物的肠道中分离到，偶尔在人类肠道中也有发现。

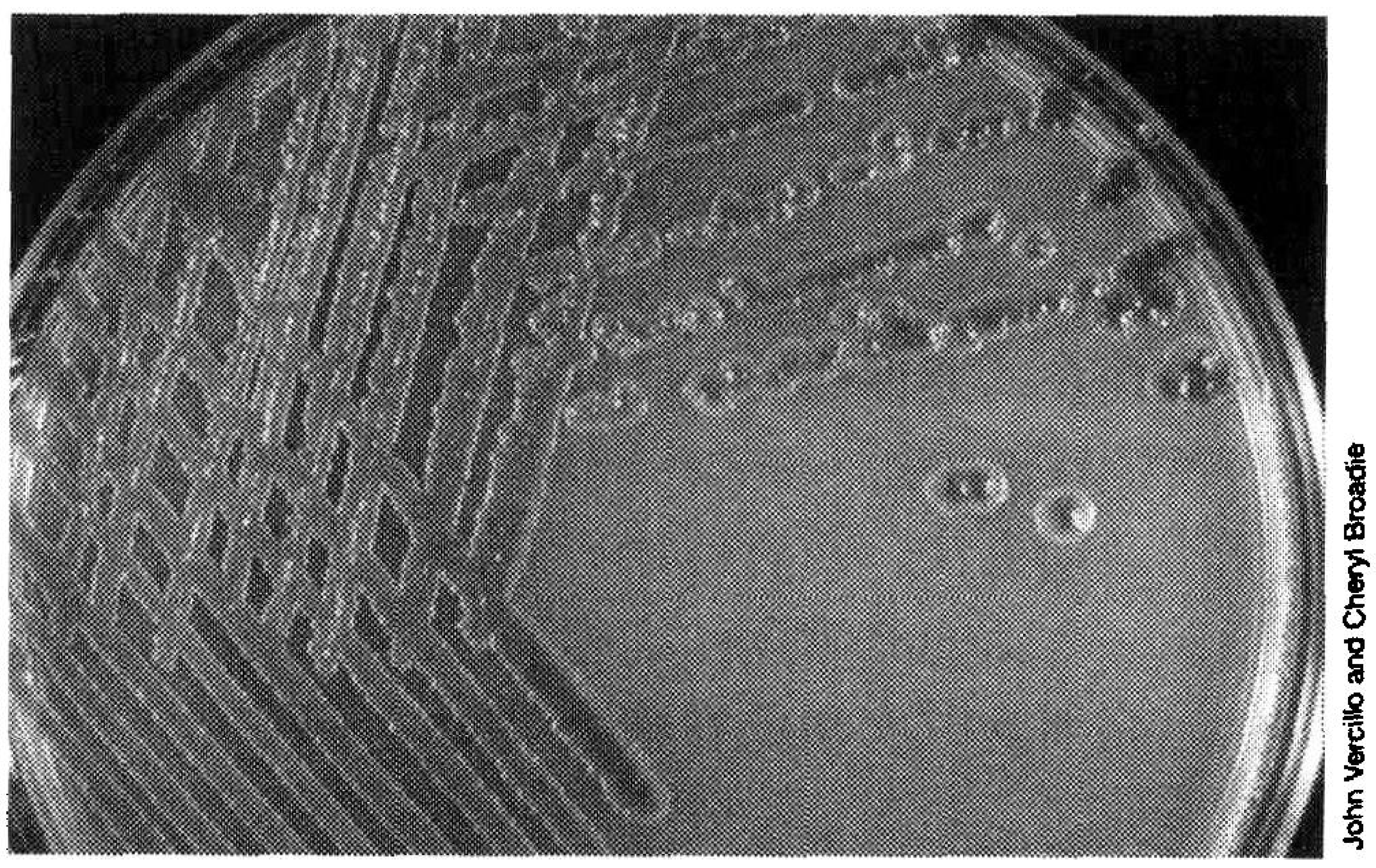


图 12.27 黏质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）菌落。呈现橘红色是由于生成了含有吡咯环的灵菌红素。

12.12 弧菌属及发光杆菌属

代表属：弧菌属（*Vibrio*）、发光杆菌属（*Photobacterium*）

弧菌属为一类革兰氏阴性、兼性需氧的杆菌（robs）和弯曲杆菌（curved robs），具有发酵的代谢机制。弧菌属的大多数成员为极生鞭毛，但也有些是周生鞭毛。弧菌与肠道细菌之间的一个关键区别在于，前者为氧化酶阳性（表 24.3），而后者为阴性。尽管假单胞菌也是极生鞭毛，氧化酶阳性，但不是发酵类型的，因此可通过单糖发酵检测与弧菌区分。弧菌类最为有名的属包括弧菌属和发光杆菌属。

绝大多数弧菌及其相关属都是水生的，在淡水和海水中均可发现。霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）能够引起人类的霍乱疾病（cholera）（见 21.11 节和 28.5 节）；该菌通常

不会感染其他的宿主。在那些不发达的、有悠久历史的国家，霍乱是最常见的感染人类的疾病（著名的早期医学微生物学家 Robert Koch 在 1884 年首先分离得到了霍乱弧菌）。病菌几乎全部是由水来传播的，19 世纪关于其分布的研究对于揭示城市地区水质净化的重要性起着重要的作用。我们将在 21.11 节讨论霍乱弧菌的病原性。

副溶血弧菌（*Vibrio parahemolyticus*）是一种海洋微生物。它是日本急性肠炎的主要原因（日本人大量食用生鱼片），也是引起其他地区如美国的急性肠炎暴发的原因。这种微生物经常可从海水中或软体动物、有壳水生动物中分离到，它主要的寄居地为海洋动物，对人类的感染是次级传播（见 28.1 节）。

发光菌属和生物发光

许多革兰氏阴性、极生鞭毛杆菌具有发光的性质，被称为生物发光（bioluminescene）。绝大多数被划分为发光杆菌属（*Photobacterium*），但是有少数弧菌也能发光（图 12.28）。大多数发光细菌（bioluminescent bacteria）是海水生物，通常与鱼有连带关系。一些鱼具有特殊的器官，其中有发光细菌生长（图 12.28c～f）。其他的海水发光细菌腐生于死鱼上，偶尔会在鱼表面形成可见的菌落。（为了易见到发光，应在眼睛适应黑暗后，在完全黑暗的室中观察；图 12.28a、b）

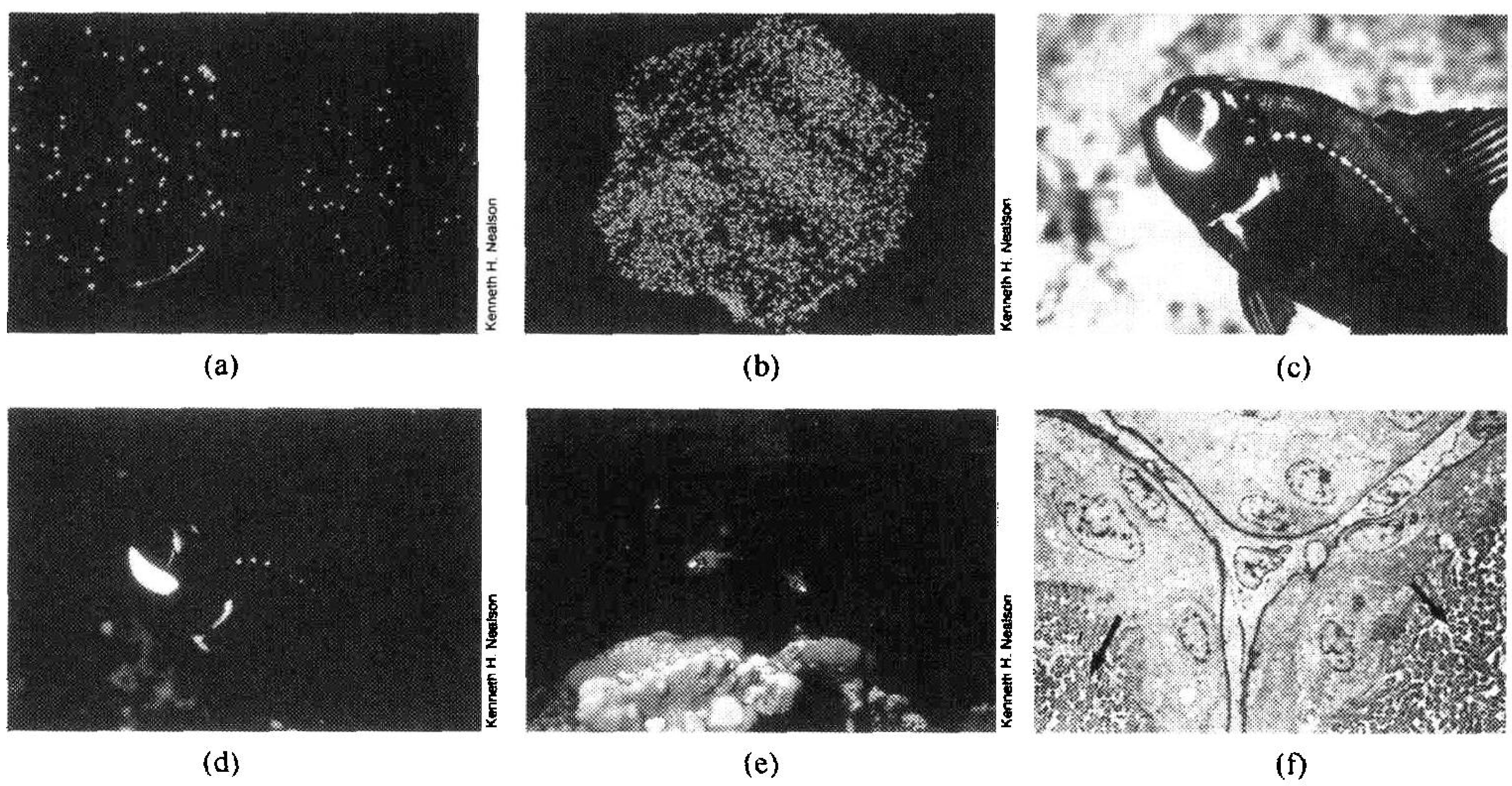


图 12.28　发光细菌及其在发光鱼的发光器官中所起的作用。（a）发光细菌的两个 Petri 平板利用它们自己的光所照的照片。注意这些不同的颜色：左边，费氏弧菌（*Vibrio tischeri*）MJ-1，蓝光；右边，费氏弧菌 Y-1，绿光。（b）利用明亮发光杆菌（*Photobacterium phosphoreum*）发光所照的菌落照片。（c）发光鱼（*Photoblepharon palpebratus*）；发光区域为含有发光细菌的发光器官。（d）一些利用自身光线所照的鱼类照片。（e）埃拉特海岸珊瑚礁中拍摄的发光鱼的水下照片。（f）发光鱼发光器官较薄部分的电镜照片，显示了发光细菌的密度排列（箭头）。

虽然发光杆菌属的分离物是兼性厌氧菌，但是它们只在 O_2 存在时发光。细菌发光还需要几种物质：萤光素酶（luciferase）和一种长链脂肪酸［如十二酸（dodecanal）］；黄素单核苷酸（$FMNH_2$）和 O_2 也参与作用。主要的电子供体是 NADH，电子通过萤光素酶的反应可表示为：

$$FMNH_2+O_2+RCHO \xrightarrow{\text{萤光素酶}} FMN+RCOOH+H_2O+\text{光}$$

产光系统通过一个支路使电子从 FMN 转移到 O_2，而其他电子受体如醌和细胞色素不参与其中。

生物发光的调控

萤光素酶显示出一种独特的调节方式叫做自动诱导作用（autoinduction）。发光细菌产生一种特殊的物质：自诱导物（autoinducer），它可以在生长期间于培养基中积累起来，当量达到一个临界水平时，酶的诱导便可发生。在费氏弧菌（*Vibrio fisheri*）中，这种自诱导物被测定出来，是 *N*-β-己酮基高丝氨酸内酯。这样，当发光细菌培养物在低细胞浓度时不会发光，只有生长达到足够高的密度，使自动诱导物能够积累并发挥作用，才能发光。这种密度依赖性的现象称为“群体感应”（quorum sensing）机制。

由于这个原因，在海洋中自由生活的发光细菌是不会发光的，自诱导物不能被积累起来，只有条件适合细菌发育为高密度时才能发光（图 12.28）。尽管还不清楚在自由生活的细菌中为什么发光是密度依赖性的，但在共生菌中（图 12.28c～f），密度依赖性的发光合理性却是比较清楚的，只有当菌体密度达到足够高时，鱼发光器官才能发出闪烁的可见光。已经把生物发光作为模型实验系统对群体感应的遗传机制进行了研究探索，并且现在已经清楚了这种调控形式并不局限于发光细菌，多种不同的需要最小细胞密度（一定的“阈值”）的细菌都呈现这种调控机制（见 8.10 节）。

概念检查

肠细菌是一大类兼性好氧杆菌，具有医学和分子生物学上的重要意义。弧菌属和发光菌属的细菌是海洋生物；其中一些种是致病性的，而另一些能够生物发光。

◆ 从生理学角度如何区别大肠杆菌（*Escherichia coli*）和产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）?

◆ 描述两个变形菌属菌株的特性，使它能够和其他肠杆菌相区别。

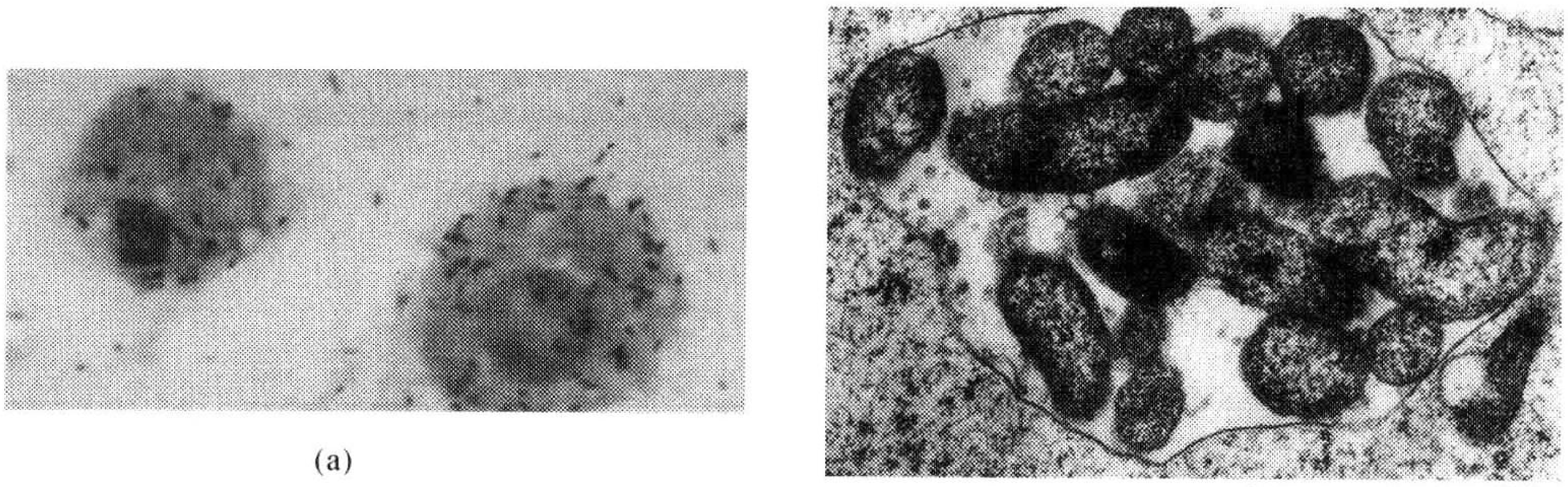
◆ 对于一种微生物如发光杆菌能够发光必需的条件是什么？

12.13 立克次氏体

代表属：立克次氏体属（*Rickettsia*），沃尔巴克氏体属（*Wolbachia*）

立克次氏体是小的、革兰氏阴性、球状或杆状的变形细菌，大小为 0.3～0.7μm 宽和 1～2μm 长。它们（除一种例外）都是专性的细胞内寄生（obligate intracellular parasite）（图 12.29），不能在没有宿主细胞存在的情况下培养，立克次氏体是一些疾病，如斑疹伤寒、落基山斑点热和 Q 热（Q-fever）的病原体（见 27.3 节）。

超薄切片的电镜照片表明，立克次氏体的细胞具有一般细菌的形态特征（图 12.29b）；细胞壁和细胞膜都是可见的。细胞壁中含有胞壁酸和二氨基庚二酸。细胞中含有 RNA 和 DNA，立克次氏体以二分裂形式进行增殖，大约 8h 生长一代。立克次氏体侵入宿主细胞是一个动态的过程，需要宿主和寄主都处于生活状态并且代谢旺盛。一



(a)　(b)

图 12.29　立克次氏体在宿主细胞中的生长。（a）立氏立克次氏体（*Rickettsia rickettsii*）生长在草原田鼠（*Microtus pennsylvanicus*）的鞘细胞中。细胞直径约为 0.3μm。（b）存在于宿主血细胞中的日本甲虫立克次氏小体（*Rickettsiella popilliae*）的电镜照片，宿主为大栗鳃角金龟（*Melolontha melolontha*）。请注意立克次氏体是在宿主细胞的液泡中生长的。

旦进入细胞，菌体首先在细胞质中复制，一直到宿主细胞充满了菌体（图 12.29，见 27.3 节）。然后宿主细胞裂解，将菌体释放到周围环境中。已经发现了立克次氏体的许多属，表 12.17 列出了其中主要的 4 个属的特性。

表 12.17　立克次氏体的主要特性

属及种	立克次氏体病	轮换宿主	细胞定位	DNA/(mol%GC)	系统发育类群[a]	与立克次氏体 DNA 杂交/%[b]
立克次氏体属（*Rickettsia*）						
立氏立克次氏体（*R. rickettsii*）	斑点热	壁虱	细胞质和细胞核	32～33	α	100
普氏立克次氏体（*R. prowazekii*）[c]	斑疹伤寒	虱	细胞质	29～30		53
斑疹伤寒立克次氏体（*R. typhi*）	斑疹伤寒	跳蚤	细胞质	29～30		36
罗卡利马氏体属（*Rochalimaea*）						
五日热罗卡利马氏体（*R. quintana*）	战壕热	虱	细胞表面	39	α	30
文氏罗卡利马氏体（*Rochalimaea vinsonii*）	—	田鼠	细胞表面	39		30
考克斯氏体属（*Coxiella*）						
伯氏考克斯氏体（*C. burnetii*）	Q 热	壁虱	液泡	43	γ	—
埃里希氏体属（*Ehrlichia*）						
恰菲埃里希氏体（*E. chaffensis*）	埃里希氏体病（人）	壁虱或家畜	单核白细胞	—	α	—
马埃里希氏体（*E. equi*）	波托马克热（马）			—	α	—

续表

属及种	立克次氏体病	轮换宿主	细胞定位	DNA/(mol%GC)	系统发育类群[a]	与立克次氏体DNA杂交/%[b]
沃尔巴克氏体[d] (*Wolbachia*)						
尖音库蚊沃尔巴克氏体 (*W. pipientis*)	—	节肢动物	细胞质	30	α	—

a. 所有都是变形细菌。
b. 在11.11节讨论了DNA∶DNA杂交。
c. 该生物体的基因组已测序，并与线粒体基因组有一些相似之处。
d. 不是人或其他动物的病原体。

新陈代谢和致病机制

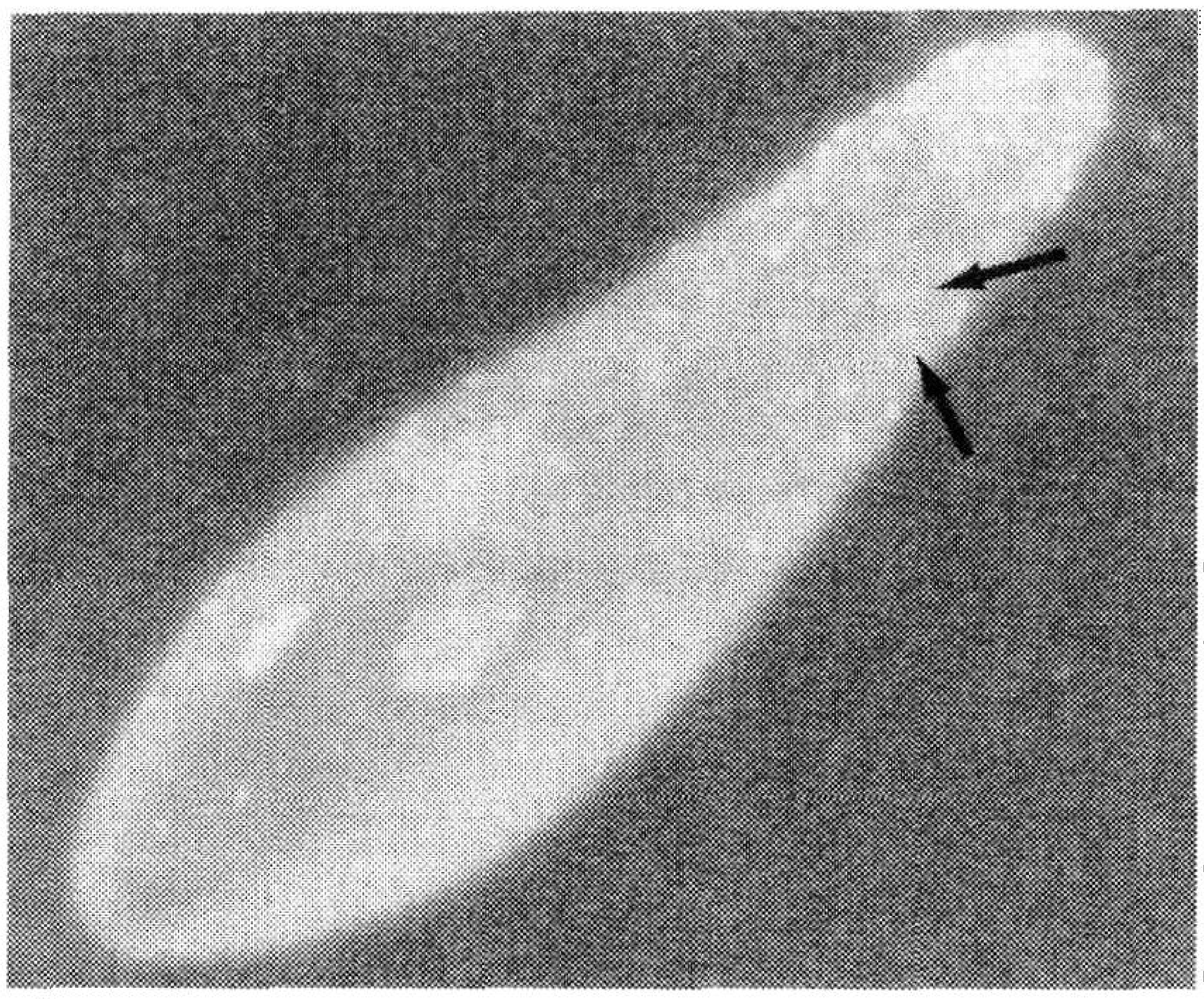
为了解释为什么立克次氏体是严格细胞内寄生，大多数研究集中于它们的代谢活动和生化反应途径。许多立克次氏体具有独特的能量代谢，只能够氧化谷氨酸或谷胺酰胺，而不能利用葡萄糖或有机酸。但是Q热病的病原体——伯氏考克斯氏体（*Coxiella burnetii*），它能够同时利用葡萄糖和丙酮作为电子供体。立克次氏体具有含细胞色素的呼吸链，能够把NADH作为电子供体进行电子转移磷酸化。它们也可以合成一些大分子合成和生长所必需的小分子，同时从宿主细胞中获得其他所需的营养物质。因此，虽然立克次氏体是寄生的，但是它仍保留有大量独立的代谢机制。

立克次氏体离开宿主后不能长时间存活，这可能也是它们为什么必须通过带菌节肢动物在动物之间传播的原因。当节肢动物从被感染的脊椎动物吸取血液后，血液中的立克次氏体可以在节肢动物中寄生下来。它们穿过胃肠道上皮细胞后进行复制，然后可以出现在粪便中。当节肢动物叮咬其他未感染动物时，立克次氏体可以直接通过口器传播，或者通过伤口与粪便接触感染。另外，伯氏考克斯氏体（见27.3节）还可以通过呼吸系统中的气溶胶进行传播。伯氏考克斯氏体是立克次氏体中对物理损伤抵御能力最强的一种，这可能是因为它形成一种类似的内生孢子，使之能够在空气中生存。

罗卡利马氏体属（*Rochalimaea*）是一类不典型的立克次氏体，因为对它们可以进行培养而不是专性的细胞内寄生。另外，当生长于组织培养物中时，罗卡利马氏体的细胞在真核生物宿主细胞的外表面（outside surface）生长，而不是细胞质或细胞核中。五日热罗卡利马氏体（*Rochalimaea quintana*）是战壕热（trench fever）的病原体，这种疾病在第一次世界大战中使成千上万的士兵丧生。埃里希氏体属（*Ehrlichia*）的细菌能够引起人类和其他动物的一些疾病，其中导致人类的埃里希氏体病（ehrlichiosis）及马的波托马克热（Potomac fever）的两种病原菌具有很大危害（见27.3节）。

沃尔巴克氏体

沃尔巴克氏体（*Wolbachia*）属于杆状的α变形细菌，是节肢动物的胞内寄生菌（图12.30）。沃尔巴克氏体在系统发生上与立克次氏体相近，能够对它们的宿主产生多种影响，包括诱导孤雌生殖（产生不育的卵细胞）、杀死雄性并雌性化（将雄性昆虫转变成雌性）。



Richard Stouthamer and Merijn Salverda

图 12.30　沃尔巴克氏体。 4′,6-二脒-2-苯基吲哚（4′,6-diamidine-2′-phenylindole dihydrochloride，DAPI，见 18.3 节）染色的被寄生宿主——黄蜂（*Trichogramma kaykai*）卵细胞的显微照片。尖音库蚊沃尔巴克氏体细胞主要位于卵细胞较窄的一端（箭头）。

尖音库蚊沃尔巴克氏体（*Wolbachia. pipientis*）是这个属种研究得比较清楚的一个种。细胞寄生于昆虫的卵细胞中（图 12.30），并在液泡中繁殖，被宿主来源的膜所包围。感染了蚊沃尔巴克氏体细胞的性宿主通过感染的卵细胞传递给它的后代。沃尔巴克氏体诱导的孤雌生殖在黄蜂中被大量发现。在这些昆虫中，雄性个体通常是由不育的卵细胞（仅含有一套染色体）孵化而来的，而雌性个体是由可育的卵细胞（含有两套染色体）孵化而来。但是，在沃尔巴克氏体感染的不育卵细胞中，微生物通过某种方式使得染色体数量加倍，这样就导致了仅产生雌性的后代。可以推测，如果给雌性昆虫喂食抗生素来杀死沃尔巴克氏体，孤雌生殖就会停止。

在地鳖虫（潮虫）中，沃尔巴克氏体属的某种细菌引起雄性发育成雌性。沃尔巴克氏体的感染破坏了雄性的激素分泌腺体。在其他的昆虫中，如瓢虫和蝴蝶，沃尔巴克氏体的感染通过某种方式使得雄性后代死亡，而不影响雌性后代。另外，这些异常生殖，对于一些沃尔巴克氏体感染的昆虫的生存具有的严重的影响。例如，在线虫中能够引起象皮病和河盲（盘尾丝虫病），抗生素治疗时在有效杀死它们的沃尔巴克氏体共生体时也会杀死这些虫子。

通常，像寄生的原核生物一样，尖音库蚊沃尔巴克氏体具有一个小的基因组（约 1.5Mb），现在已经测得了全序列。尽管这种寄生菌不会引发其脊椎动物或无脊椎动物宿主的疾病，但是它们对于昆虫繁殖的影响引出了这样有趣的问题：它们对昆虫的一个主要类别（节肢动物占所有已知昆虫的 70%）的进化和物种形成产生了影响范围。然而，由于沃尔巴克氏体与昆虫的关联很普遍，这表明真正的沃尔巴克氏体—昆虫共生体繁殖影响是次级的影响。这是因为，通过感染昆虫，沃尔巴克氏体细胞获得了营养来源和一个受保护的环境，而同时昆虫也通过一些不为人所知的方式受益于这种共生关系。

概念检查

立克次氏体是专性胞内寄生菌，其中许多种能引起疾病。立克次氏体属的许多代谢功能不完善，许多关键的代谢物是从宿主获得的。

◆ 给出一种立克次氏体引起的疾病的名称。

◆ 解释“专性细胞内寄生”这个短语的含义。

12.14 螺菌

代表属：螺菌属（*Spirillum*）、蛭弧菌属（*Bdellovibrio*）、弯曲杆菌属（*Campylobacter*）

螺菌（spirilla）是一种具有广泛生理属性的革兰氏阴性、可运动的螺旋状杆菌。这类细菌的分类标准主要有：细胞形状及大小，极生鞭毛（单个或多个），与氧气的关系（专性好氧、微好氧及兼性好氧），与植物的关系（共生或植物病原菌）或与动物的关系（病原菌），发酵能力及其他一些生理特性（固氮能力、嗜盐性及嗜热性）。在表 12.18 中列出了我们将要讨论的各种属，我们可以看到螺菌在变形细菌的 5 个亚类中都有分布。

表 12.18 螺旋形细菌属的特性[a]

属	系统发生类群[b]	特性	DNA/(mol%GC)
螺菌属（*Spirillum*）	β	细胞直径 1.7μm；微好氧；淡水	36～38
水螺菌属（*Aquaspirillum*）	α或β	细胞直径 0.2～1.5μm；好氧；淡水	49～66
磁螺菌属（*Magnetospirillum*）	α	弧菌形到螺菌形；细胞直径约 0.3μm；含有磁小体（magnetosome）；微好氧	65
海洋螺菌属（*Oceanospirillum*）	γ	细胞直径 0.3～1.2μm；好氧；海洋（需 3% NaCl）	42～51
固氮螺菌属（*Azospirillum*）	α	细胞直径 1μm；微好氧；土壤和植物根部；固氮	68～70
草螺菌属（*Herbaspirillum*）	β	细胞直径 0.6～0.7μm；微好氧；土壤和植物根部；固氮	66～67
弯曲杆菌属（*Campylobacter*）	ε	细胞直径 0.2～0.8μm；微好氧到厌氧；人类和动物的病原菌或共生菌；单端极生鞭毛	30～38
螺杆菌（*Helicobacter*）	ε	细胞直径 0.5～1μm；丛生或极生鞭毛；与人类幽门溃疡有关	36～38
蛭弧菌属（*Bdellovibrio*）	δ	细胞直径 0.25～0.4μm；好氧；捕食其他细菌；单端极生有鞘鞭毛	33～52
弯杆菌属（*Ancylobacter*）	α	细胞直径 0.5μm；弯曲杆状形成圆环；不运动；好氧；有时有气泡	66～69

a. 全部是革兰氏阴性且呼吸的，但是不发酵。

b. 全部都是变形细菌。

螺菌属、水螺菌属、海洋螺菌属及固氮螺菌属

这些螺旋形的杆菌是通过极生鞭毛（通常在两极成簇）进行运动的（图 12.31b）。其螺旋的圈数多种多样，从不到一圈（看上去像弧菌）到有许多圈。有许多圈的螺菌从表面上看似螺旋体（见 12.33 节），但在系统发生上却与螺旋体有明显的不同。另外，螺菌具有典型的细菌鞭毛，不含有螺旋体鞭毛所具有的外鞘和轴丝。

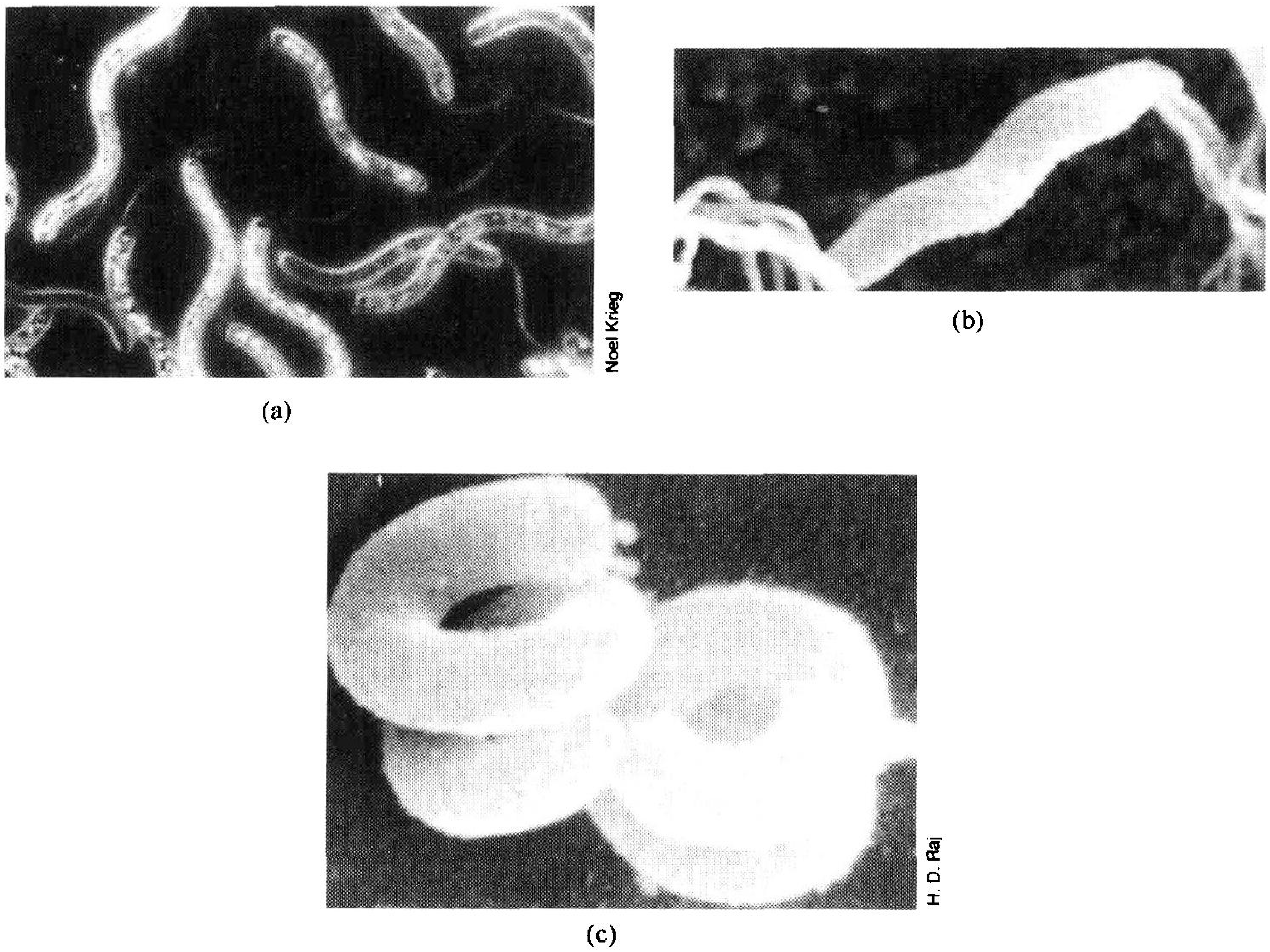


图 12.31　螺菌。(a) 一种大螺菌，迂回螺菌的相差电子显微照片。细胞大小 1.5μm×25μm。(b) 一种肠螺菌的扫描电镜照片。注意极生的鞭毛簇和细胞表面的螺旋结构。(c) 水生弯杆菌（*Ancyclobacter aquaticus*）细胞的扫描电镜照片。细胞直径 0.5μm。

有些螺菌很大，用早期的显微镜都能够看到。在 1670 年，安东尼·吕文虎克（Antoni van Leeuwenhoek）首次观察到了螺菌（见 1.5 节），在 1832 年原生动物学家 Ehrenberg 首次创立了该种。这些科学工作者所观察到的细菌迂回螺菌（*Spirillum volutans*）是一种较大的细菌（图 12.31a）。与其相似的一种自养菌是硝化螺菌（图 12.4b）。迂回螺菌是微好氧的，需要 O_2 但当其含量达到正常水平时菌体生长将受到抑制。迂回螺菌的另外一个重要特征是形成含有多聚磷酸盐的颗粒（异染粒）（图 12.3a，见 4.11 节）。

生脂固氮螺菌（*Azospirillum lipoferum*）是一种固氮菌，在 1922 年由 Beijerinck 最先描述并命名为产脂螺菌（*Spirillum lipoferum*）。人们对这种菌有很大兴趣，因为已经发现它与热带草丛及谷物之间的共生关系有关。尽管这种共生关系不像根瘤菌和豆科植物（见 19.22 节）之间那么紧密，但明显有助于谷物对氮的固定。

细胞直径小的螺菌（不是微好氧）被分为两个属：水螺菌属（*Aquaspirillum*）及海洋螺菌属（*Oceanospirillum*）。前者生活在淡水中，而后者生活在海水中并需要 NaCl 来生长（表 12.18）。已经描述了水螺菌属和海洋螺菌属的很多种，不同种根据生理学和系统发育学来划分。这些细菌无疑对水生环境中有机物质的再循环起着重要作用。

趋磁性螺菌

从淡水中已经分离到具有强游动能力的微好氧螺菌。这种细菌在磁场的作用下可做直线运动，称为趋磁性（magnetotaxis）。在人工磁场中趋磁性螺菌能很快地使其沿着磁场的南北极方向排列。细胞中存在 5～40 个被称为磁小体（magnetosome）的磁颗粒链，由磁铁矿（Fe_3O_4）和磁硫铁矿（Fe_3S_4）组成（见 4.11 节和 4.42 节）。具有磁性功能的磁小体使细胞在特殊的电场中的排列具有方向性。

趋磁性细菌根据其细胞内磁颗粒的方向可具有两个极性中的一个。在细胞的北半球含有趋北极的磁颗粒并在鞭毛的作用下向北运动；而在细胞的南半球则具有相反的极性并向南运动。尽管细菌的磁性在生态学上的意义并不清楚，但已表明，它们在磁场中可定向的能力对于定位这些微好氧细菌趋向沉降带附近的低氧区方面具有选择优势。向磁磁螺菌（*Magnetospirillum magnetotacticum*）（图 12.32 和表 12.18）是该家族的主要成员。

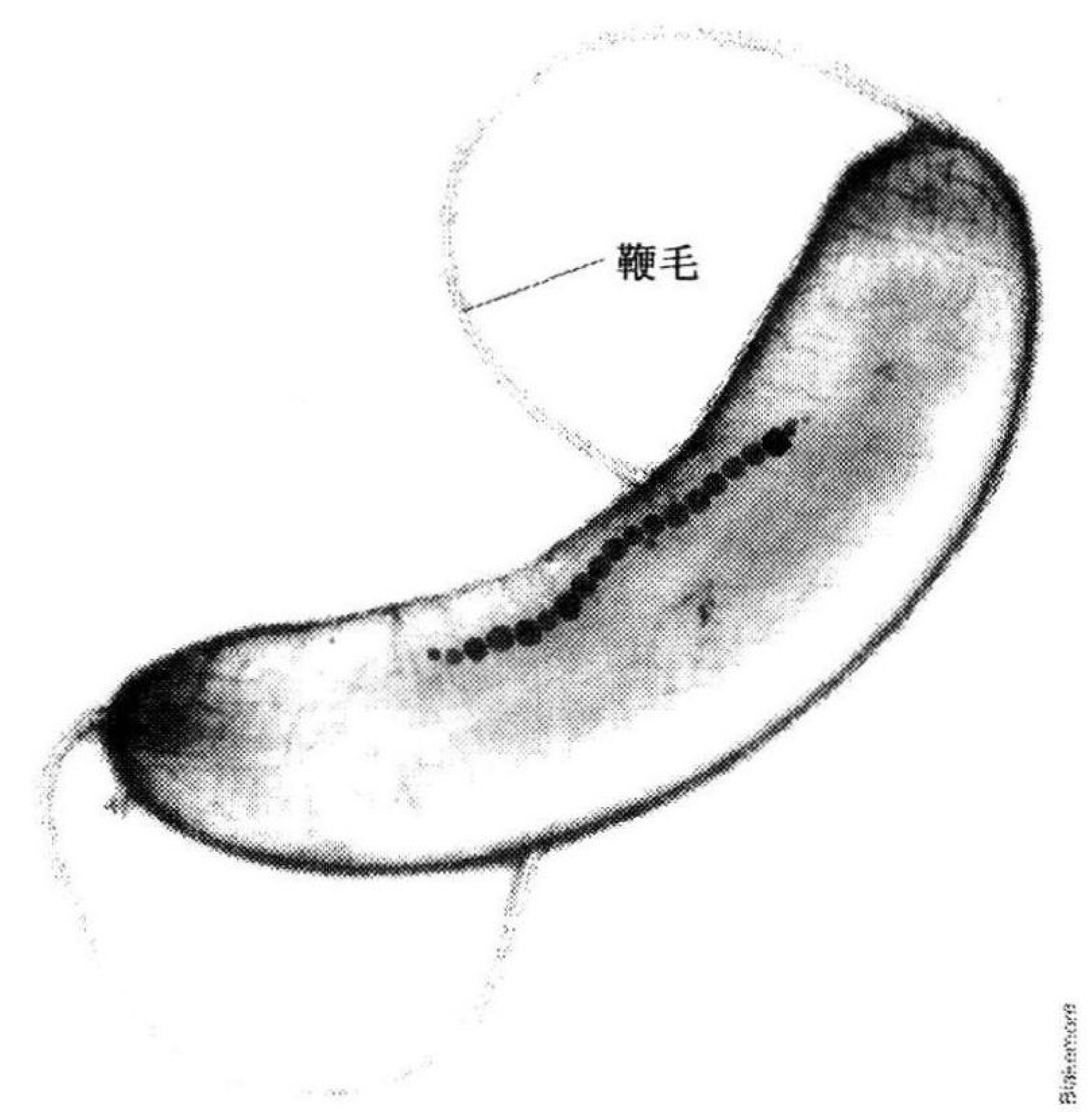


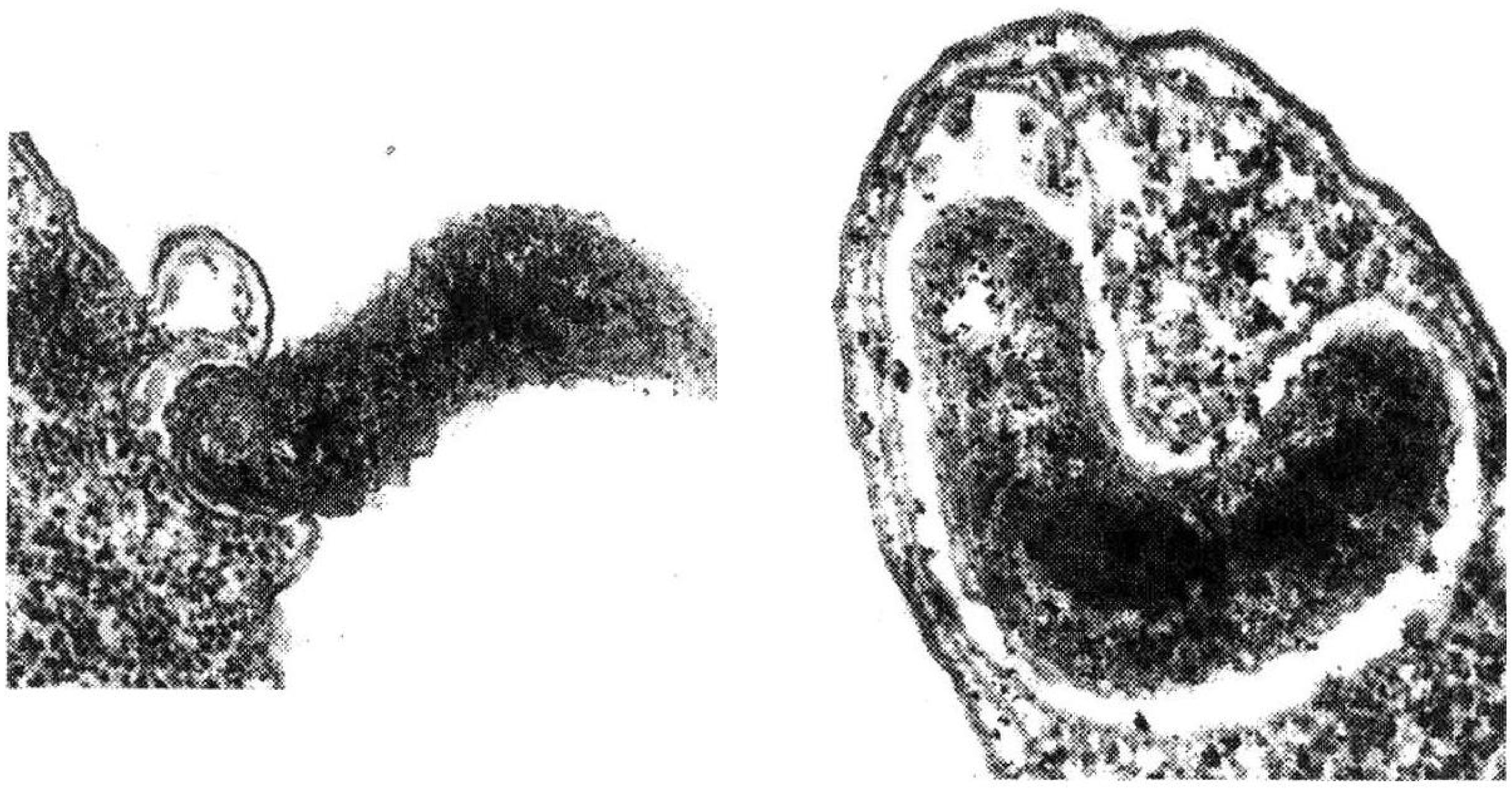
图 12.32 一种趋磁螺菌，向磁磁螺菌的负染电镜照片。细胞大小为 0.3μm×2μm。该菌含有被称为磁小体的 Fe_3O_4（磁性）颗粒，并排列成链。颗粒使细胞沿磁场线排列。该菌株分离于 Durham，New Hampshire 的一个水处理厂。

蛭弧菌

这些小蛭弧菌具有捕食其他细菌并将其作为自身细胞质组分的特殊性质。这些细菌很小，但细胞可高速运动并常附着于被捕食细胞的表面。由于后面这个特性而被命名为

蛭弧菌（Bdellovibrio，bdello 是一个组合形式，意思是“依附于别人”）。分离到的另一种捕食性细菌命名为吸血弧菌属（*Vampirococcus*）。不过蛭弧菌具有一种特殊的袭击方式并且是胞膜内质性的。

当蛭弧菌的细胞捕食进攻时，穿透猎物细胞壁并在壁与膜之间（壁膜间隙）进行复制，最终形成一种球形结构的蛭质体（bdelloplast）。图 12.33 是侵袭和渗透阶段的电子显微镜照片，并在图 12.34 中进行了图解。蛭弧菌可侵袭各种革兰氏阴性菌；但不侵袭革兰氏阳性菌。



(a)　(b)

图 12.33　蛭弧菌（*Bdellovibrio*）吸附和穿透一个捕食细胞的步骤。一个蛭弧菌细胞直径约 0.3μm。（a、b）一个食菌蛭弧菌（*Bdellovibrio bacteriovorus*）准备侵袭大肠杆菌（*E. coli*）的超薄切片的电镜照片。（a）早期穿透。（b）完全穿透。蛭弧菌细胞被捕食细胞的蛭质体膜所包围并且在细胞膜与细胞壁的间隙复制（图 12.34）。

蛭弧菌是专性好氧菌，能够通过氧化氨基酸和乙酸盐获得能量。另外，蛭弧菌可以从其寄主中直接同化核苷酸、脂肪酸、多肽甚至完整的蛋白质，而不必先将其细胞裂解。因此蛭弧菌这种侵袭模式的存在显然与其自身有趣而特异的生化过程有关。然而除了这种侵袭的生活方式外，还可从侵袭菌株蛭弧菌中分离到不依靠捕食的菌株，表明侵袭并不是特异性的。不依靠捕食为生的菌株可在含有酵母提取物和蛋白胨的复合培养基上生长。

从系统发育上讲，蛭弧菌属于变形细菌的 σ 群（图 12.1），含有大小约为大肠杆菌一半的基因组。从分类学上讲，DNA 杂交分析结果支持蛭弧菌属的两个种及食菌蛭弧菌属的一个种（见 11.11 节）。

蛭弧菌成员广泛分布在土壤、水和海洋中。它们的检测与分离方法可以参考有关细菌病毒的研究（见 9.4 节）。首先，使被侵食细菌在琼脂板上长满一层，然后将其与经滤膜过滤后的少量土样悬液一起培养；该滤膜能够截留大多数细菌，而允许小蛭弧菌细胞通过。在琼脂平板上，存在蛭弧菌的地方会形成类似噬菌斑的斑点。不过，噬菌斑只有在细菌宿主生长时才会持续变大；而蛭弧菌斑能够在被侵食细菌停止生长后仍继续增大，最终在琼脂表面形成一个大斑。蛭弧菌的纯培养可从这一蚀斑中分离到。由于蛭弧菌能够从广泛多样的土壤中获得，因此它们也是土壤细菌种群中的常见菌。

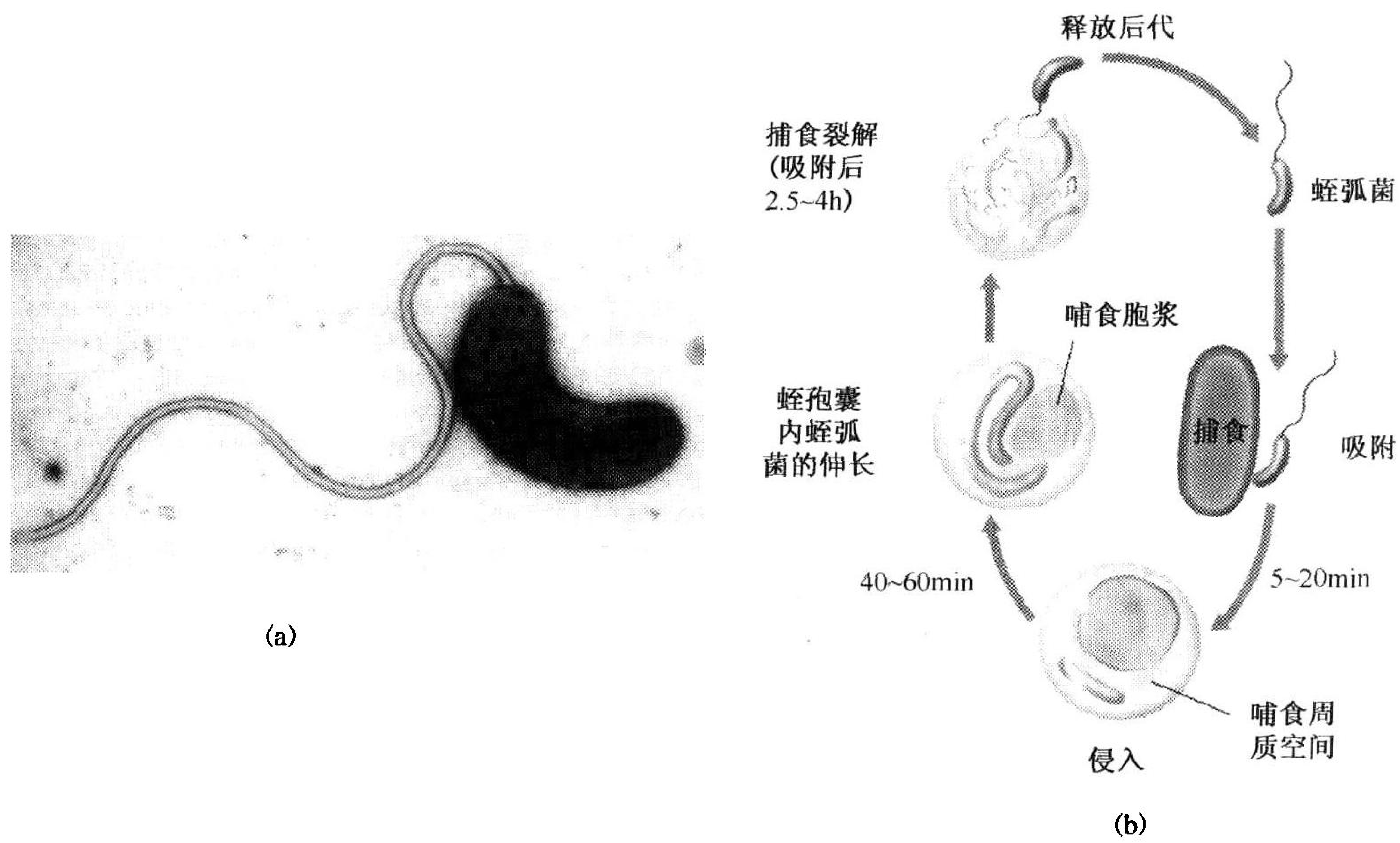


图 12.34 食菌蛭弧菌（*Bdellovibrio bacteriovorus*）侵袭细菌的发展过程。（a）食菌蛭弧菌的电镜照片。注意蛭弧菌有很长的鞭毛（图 4.54）。（b）侵袭过程。侵袭主要发生在一个高速运动的蛭弧菌和一个革兰氏阴性菌之间，从吸附到穿透细胞进入捕食的膜壁间隙。一旦进入，蛭弧菌便伸长并且在 4h 之内释放出子代蛭弧菌。子细胞释放的数量与被捕食细胞的大小相关。例如，每个被侵染的大肠杆菌能够释放 5～6 个蛭弧菌，而螺菌可释放 20～30 个。

弯杆菌属

弯杆菌属（*Ancyclobacter*）的细菌是环状、不运动的化能有机营养生物（图 12.31c）。他们与弧菌非常相似并广泛分布于水域环境中。与弯杆菌属相对应的光养方式存在于紫色非硫细菌红环菌（*Rhodocyclus purpureus*）中（图 12.6e）。

弯曲杆菌及螺杆菌

这两个属是 ε-变形细菌的主要代表。它们是革兰氏阴性、可运动的螺菌，大多数种对人或其他动物有致病性。弯曲杆菌属（*Campylobacter*）和螺杆菌属（*Helicobacter*）均为微好氧菌，是从低氧（3%～15%）高 CO_2（3%～10%）环境，弯曲杆菌引起急性肠炎中的临床标本中培养的。通常会导致出血性腹泻，致病性基于几个原因，包括与霍乱毒素有关的内毒素（见 21.11 节）。幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）与弯曲杆菌相近，同样引起急性和慢性胃炎，导致胃溃疡的形成。在 29.9 节我们将讨论由弯曲杆菌和螺杆菌引起的疾病，包括菌的传播方式和临床症状。

概念检查

螺菌是螺旋形、化能有机营养菌，广泛分布于水环境中。螺杆菌属（*Helicobacter*）和弯曲杆菌属（*Campylobacter*）是病原螺菌。螺菌分布于变形细菌的 5 个亚类之中。

◆ 什么是异染粒（volutin granule)?

◆ 在螺菌中，蛭弧菌和磁螺菌独特的地方是什么？

12.15 鞘变形细菌：球衣菌属及纤发菌属

代表属：球衣菌属（*Sphaerotilus*)、纤发菌属（*Leptothrix*)

鞘细菌是丝状β变形细菌的一类微生物（表 12.1)，有独特的生活史，可以在一根管腔或鞘中形成有鞭毛的分生孢子细胞。在某种条件下（通常为不适条件)，分生孢子散开分布到新的环境中，留下空鞘；在适宜的环境中，营养体细胞在丝状体中生长，形成长的包裹细胞的鞘。鞘细菌在有机物丰富的淡水中很常见，如被污染的溪流、水流过滤器，以及污水处理厂的活性污泥消化器（见 28.2 节)，而且主要存在于流动的水体中。鞘细菌可以形成氧化铁或氧化锰的外壳，使生境中的铁或锰化合物减少（图 17.29)。铁的沉积可能是化学反应的结果，但有些鞘细菌具有把锰氧化为二氧化锰的能力。目前主要分离出 2 个属：球衣菌属，无锰的氧化作用发生；纤发菌属，可以氧化 Mn^{2+}。

球衣菌属

球衣菌属的菌丝体是由一串细杆型的细胞构成的，它们圆形的末端紧密地包裹于外壳中。当鞘中充满细胞时，这层薄且透明的鞘很难被看到。但如果鞘的部分是空的，则很容易通过相差显微镜（图 12.35a）或染色观察到。单个细胞宽 1～2μm，长为 3～8μm，为革兰氏阴性。

鞘内的细胞以二分裂的方式分开（图 12.35b)，新的细胞被推到末端并合成新的鞘物质，这样的鞘其合成总是位于丝状体的尖端（tip)。当营养供给不足时，细胞会逐渐地从鞘中被释放出来。这些自由的细胞非常活跃，鞭毛为丛生（成为一束)（图 12.35c)。也许在细胞离开鞘之前，鞭毛就已经被合成了；如果真是这样，可能鞭毛对细胞的释放起辅助作用。一般认为，分生孢子经过迁移、吸附在一些固体表面后开始萌发生长，每个分生孢子都将是一条新菌丝体的前体，而外鞘则是一种蛋白质、糖和脂的复合物，缺少胞壁酸和肽聚糖及其他的细胞壁组分；它不同于大多数革兰氏阴性菌形成的荚膜（见 4.10 节)，因为球衣菌形成的外鞘为线状结构。

球衣菌的营养具有多样性，能够利用多种简单的有机物作为碳源和能源，并以无机物为氮源。为了适应在流水中生存，球衣菌是一种专性需氧菌。在秋季的溪流中，当落叶造成水中有机物含量暂时升高时，球衣菌就会大量繁殖。它的菌丝体是被环境工程师称之为“污水真菌”微生物复合体中的主要组分。在被污染的溪流里，可以在岩石上看到类似真菌的菌丝体。在活性污泥厂中（见 28.2 节)，球衣菌的生长与贝日阿托氏菌（*Beggiatoa*)（见 12.4 节）一样，与称之为“污泥膨胀”的有害条件有关。球衣菌的菌丝体缠绕在一起，增加活性污泥的体积；使污泥的能量无法正确释放，给污泥的清洗造成困难。

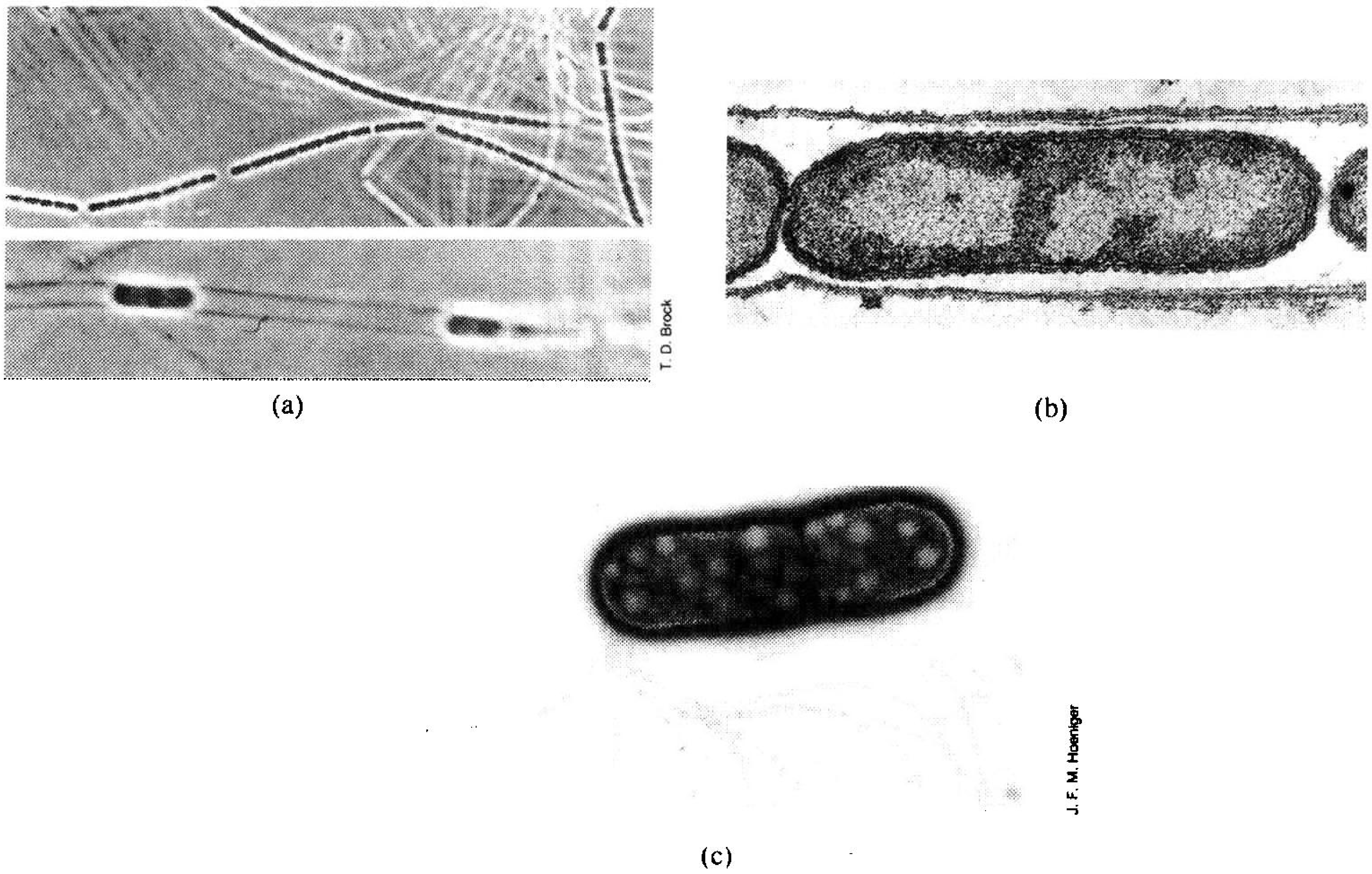


图 12.35 浮游球衣菌（*Sphaerotilus natans*）单细胞宽约 2μm。(a) 从污染的河流中采集材料的相差显微镜照片。活跃的生长阶段（上）及离开鞘的游走细胞。(b) 丝状体薄切片的电镜照片。(c) 游走细胞的负染照片。注意极生鞭毛簇。

纤发菌属

球衣菌和纤发菌在其外壳上沉积氧化铁的能力已经研究得较为清楚。这种由铁包裹的外鞘在含铁丰富的水体中经常看到（图 12.36）。铁沉积的过程如下：在含铁丰富的水中，铁与有机物如腐殖质或单宁酸形成可溶于水的螯合物；而鞘细菌可以分解这些可溶性的螯合物氧化有机成分。当有机成分可被吸收并作为碳、氮源被利用时，铁会在外鞘区沉积下来。

除了 Fe^{2+} 的氧化，纤发菌还可将 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{4+}。反应是放能的：

$$Mn^{2+} + 1/2O_2 + H_2O \rightarrow MnO_2 + 2H^+ \quad \Delta G^{0'} = -68kJ$$

有证据表明，细胞中 Mn^{2+} 的氧化与能量释放反应相偶联，同时发生电子转移及形成质子动力。

已经分离到编码纤发菌 Mn 氧化蛋白的基因，生化研究表明，鞘中的蛋白质残基并不存在于细胞中。因此，纤发菌的外鞘是能量代谢的关键所在。

12.16 芽生细菌和有附属器的柄细菌

代表属：生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）、柄杆菌属（*Caulobacter*）

这类数量大并且相对异源的 α 变形细菌的细菌种群能够形成各种各样的细胞质突起物：柄（stalk）、菌丝（hyphae）或附属物（appendage）（表 12.19）。这些突起物的直径比成熟的细胞小，含有细胞质并结合于细胞壁边缘，被统称为臼叶（prosthecae）（图 12.37）。

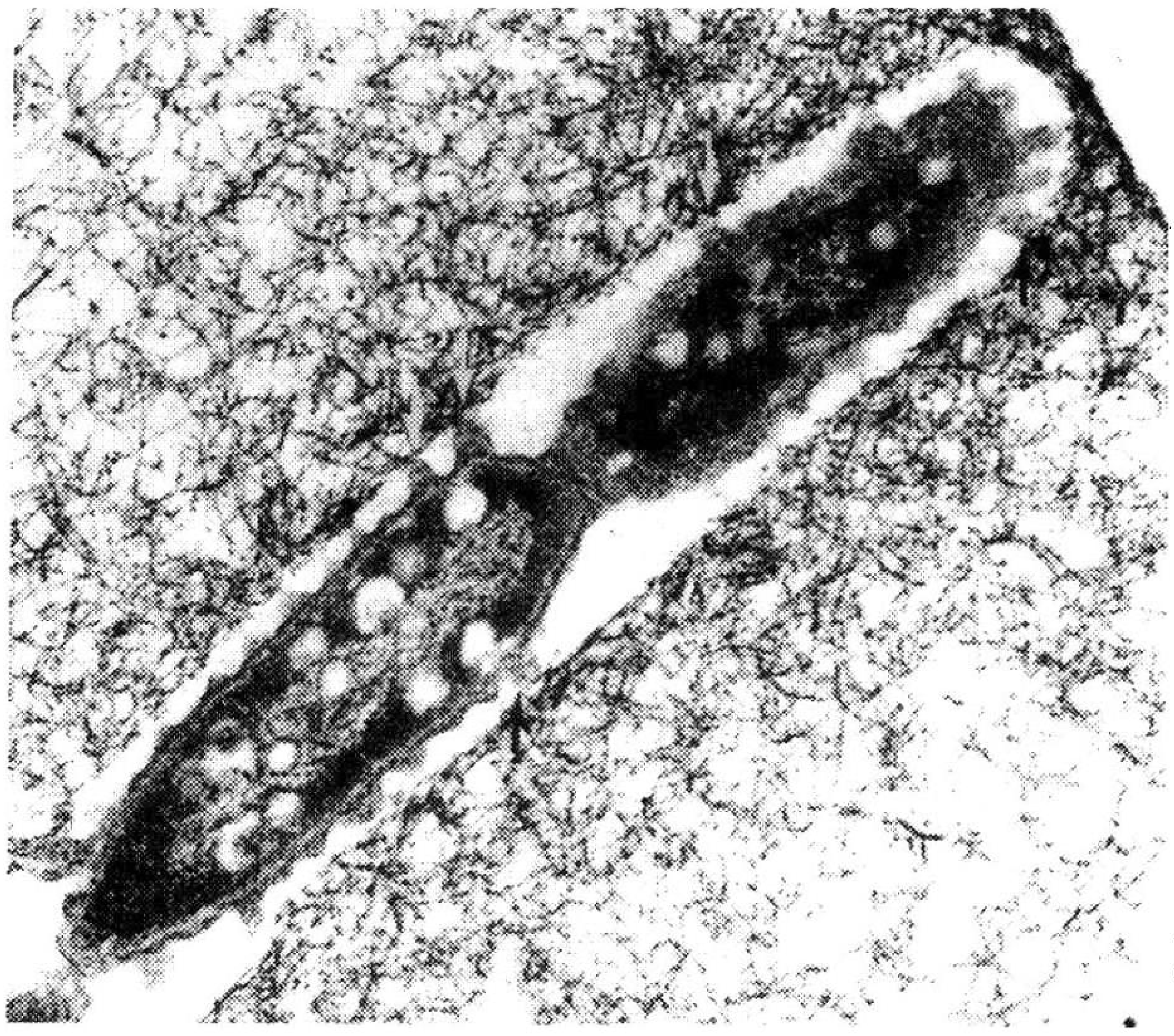


图 12.36 纤发菌属（*Leptothrix*）及铁的沉积。在纽约 Ithaca 的沼泽地的锰铁膜上获得的纤发菌的薄切片透射显微镜照片。细胞直径 0.9μm。注意细胞膜与鞘接触的突起（箭头所指）。

表 12.19 有柄的、有附属器的（附体）和芽生细菌的特征

特征	属别	系统发育类群[a]	DNA/(mol%GC)
有柄的细菌			
柄是细胞质的延伸并参与细胞分裂	柄杆菌属（*Caulobacter*）	α	62～67
有柄的，融合状的细胞	突柄杆菌属（*Prosthecobacter*）	α	54～60
有柄的，但柄是排泄产物而不含有细胞质：			
柄沉淀铁，细胞弧形	嘉利翁氏菌属（*Gallionella*）	β	55
后期排泄出胶质状的柄，不沉淀铁	涅氏柄杆菌属（*Nevskia*）	γ	60
有附属器（附体）的细菌			
单个或双附体	不黏柄菌属（*Asticcacaulis*）	α	55～61
多个附体			
短附体，经细胞分裂呈多个，有些含有气泡	突柄微菌属（*Prosthecomicrobium*）	α	64～70
平坦的，星形的附体，有些含有气泡	星状菌属（*Stella*）	α	69～74
长附体，经芽生呈多个，有些含有气泡	臂微菌属（*Ancalomicrobium*）	α	70～71
芽生细菌			
光养的，形成菌丝	红微菌属（*Rhodomicrobium*）	α	61～63
光养的，芽生没有菌丝	红假单胞菌属（*Rhodopseudomonas*）	α	64～72

续表

特征	属别	系统发育类群[a]	DNA/(mol%GC)
芽生细胞			
有机化能营养，杆状细胞	芽生杆菌属（*Blastobacter*）	α	59～66
有机化能营养，在纤细的菌丝尖端出芽		α	
从母细胞形成单菌丝	生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）	α	59～65
从母细胞形成多菌丝	土微菌属（*Pedomicrobium*）	α	62～67

a. 全部为变形细菌。

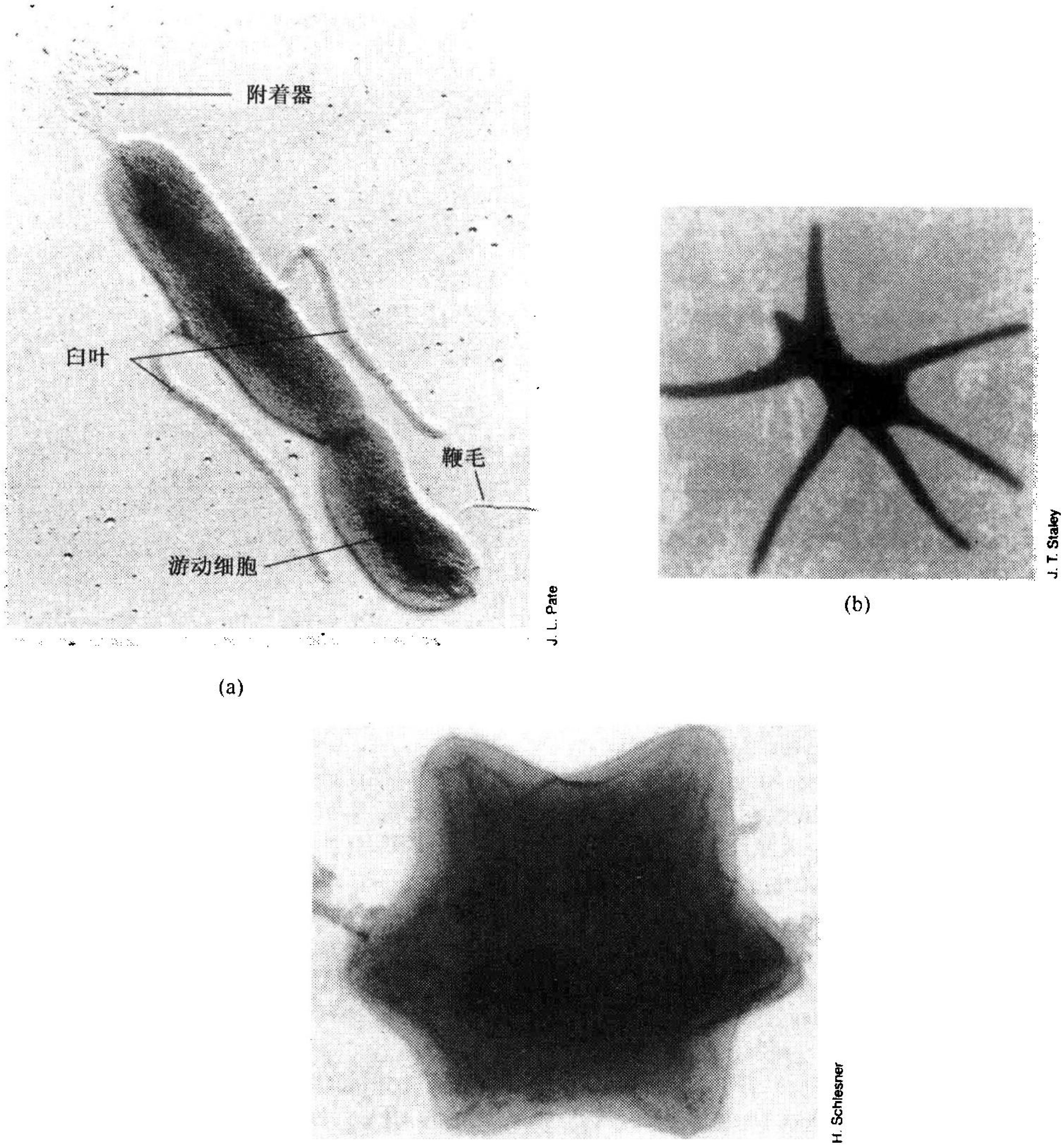


图 12.37 柄细菌。（a）双鞘不黏柄菌（*Asticcacaulis biprosthecum*）的电子显微照片，表明了附体存在的位置及排列方式。细胞约 0.6μm 宽，图注也标出了分化过程中的固着器和游动细胞。（b）游离臂微菌（*Ancalomicrobium adetum*）细胞负染色制备物的电子显微照片。附属物是细胞性质的（附体），它们位于细胞壁边缘并含有细胞质，其直径约 0.2μm。（c）星状菌属（*Stella*）的电子显微照片。细胞直径约 0.8μm。

芽生细菌的细胞分裂将导致不对称的细胞生长（unequal cell growth）。与典型的细菌细胞分裂即通过二分裂（binary fission）形成两个相同的细胞相比，有柄的和出芽的细菌，在其细胞分裂的整个过程完成后形成一个新的子细胞而母细胞仍保留其同一性（图 12.38）。芽生菌的代表属及各属细菌的不对称分裂过程如图 12.38 所示。

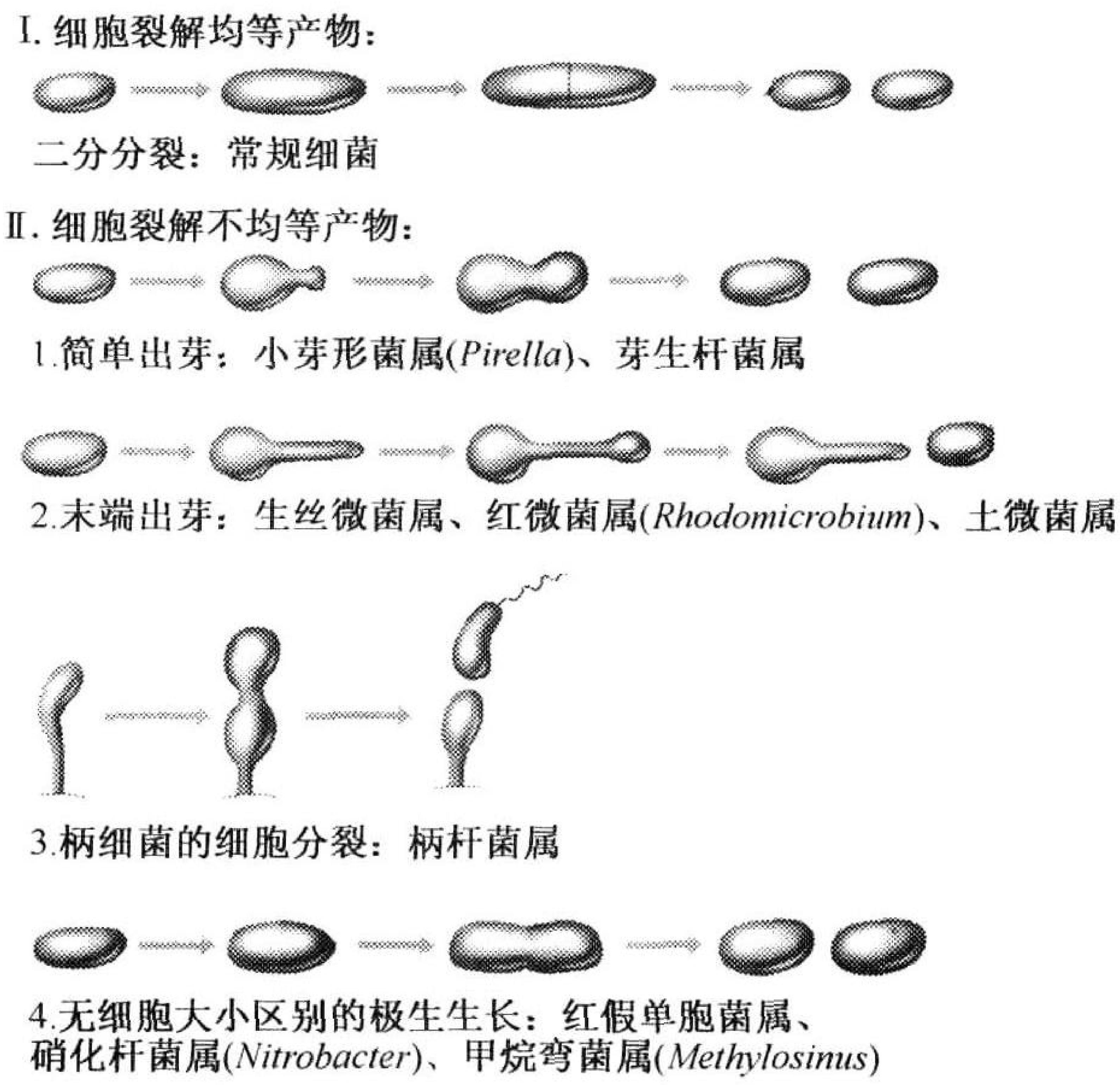


图 12.38　细胞分裂。一般细菌与出芽和有柄细菌细胞分裂的对照。

这些细菌与普通细菌的区别并不在于它们形成柄或出芽，而在于它们从一点（极端生长）而非从整个细胞（居间生长）形成新细胞壁。一些不是芽生菌的属表现出无细胞大小变化的极端生长（polar growth）（图 12.38）。极端生长带来的一个重要结果是一些内部结构，如细胞膜复合体没有进行细胞分裂，从而比经过胞间生长形成了更为复杂的内部结构。许多芽生菌，尤其是光养类细菌，含有广泛的内膜系统。

芽生细菌：生丝微菌属

研究得最深入的芽生细菌有两个属：一个是异养型的生丝微菌属（*Hyphomicrobium*），另一个是光合自养的红微菌属（*Rhodomicrobium*）；这两个属都具有从细长的菌丝末端生出的芽体。菌丝是母细胞的一种细胞的直接延长（图 12.39 和图 12.40b），含有细胞壁、胞质膜、核糖体，偶尔还有 DNA。

图 12.39 所示的是生丝微菌属的繁殖过程。母细胞通常吸附于一种固体基质上，它所形成的外突生长经延伸成为菌丝（hypha），而芽体（bud）形成于菌丝的末端。芽体膨大后形成鞭毛，脱离母细胞并游动出去。随后，子细胞失去鞭毛，并在一段成熟期后形成菌丝和芽体。另外，芽体也可以从母细胞菌丝的尖端形成由菌丝连接在一起的细胞排列（图 12.40a）。有些情况下，芽体直接从母细胞中形成，并没有菌丝的形成；另外一些情况下，细胞从两个末端形成菌丝（图 12.40a）。

芽生周期中染色体复制很有趣（图 12.39）。首先是母细胞中的染色体复制，然后

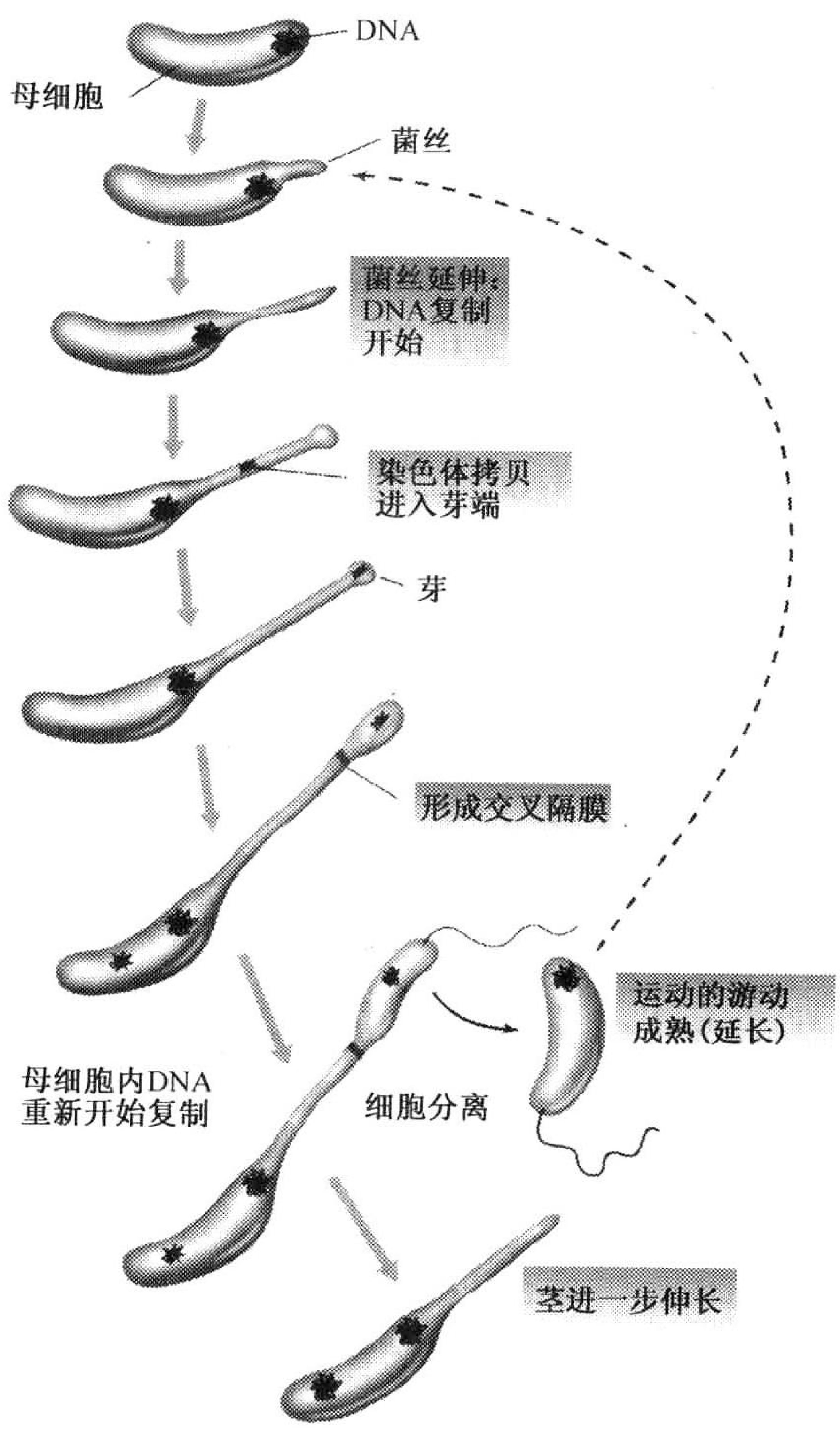


图 12.39　生丝微菌属细胞周期的各个阶段。生丝微菌属的单位染色体是环状的。

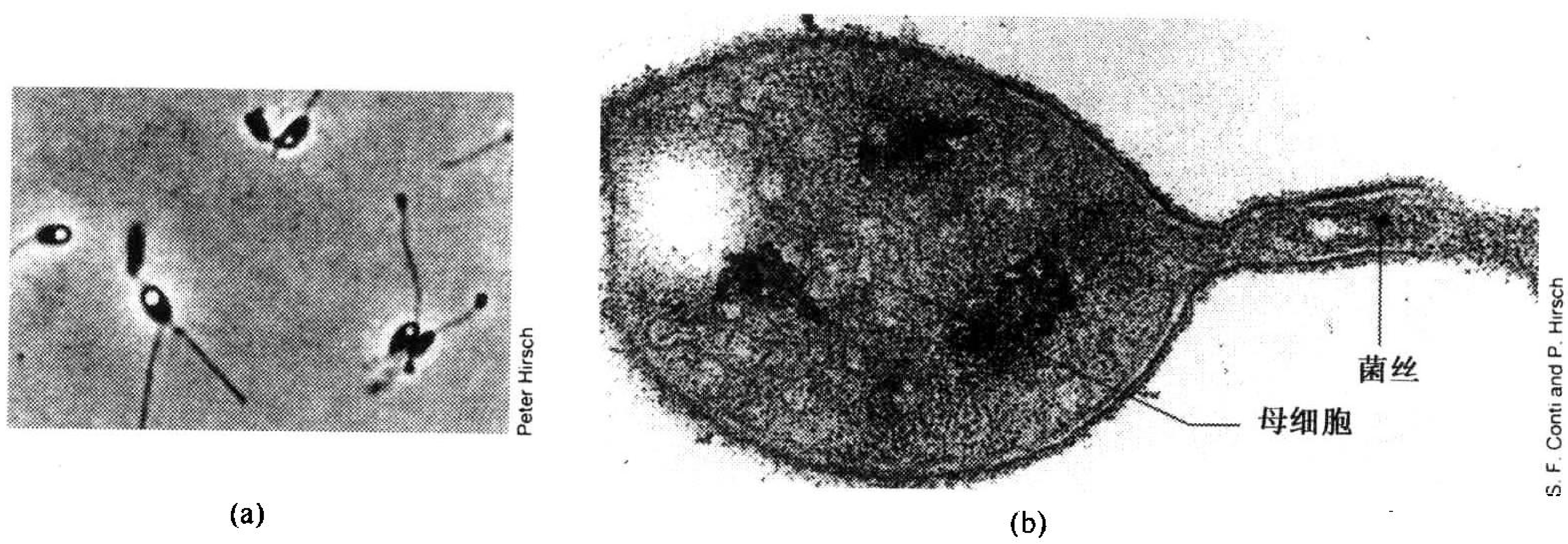


图 12.40　生丝微菌属细胞的形态。(a) 生丝微菌属细胞的相差显微照片。细胞直径约 0.7μm。(b) 生丝微菌属单个细胞的超薄切片电子显微照片。菌丝约 0.2μm 宽。

一旦形成芽体，则环状染色体的复制便沿着菌丝移动进入芽体。随之形成一个横隔，最后芽体从菌丝与母细胞分裂开来。

生丝微菌属是一种甲基营养菌（见 12.6 节），广泛存在于淡水、海水及陆地生境中。适宜利用的碳源为一碳化合物，如甲醇、甲胺、甲醛和甲酸酯。利用该菌能在营养很少的环境中生长的能力，可制备富集培养基。用不含有机碳和氮的无机盐培养基对其进行富集，同时还要接入土壤、泥或水。经过几周的培养，用生长出来的表面膜接种于甲胺或甲醇为唯一碳源的琼脂培养基上，然后用显微镜检查生丝微菌属特有菌落形态（图 12.40）。另一种特殊的富集该菌的方法是在无氧的条件下，以甲醇为电子供体并以硝酸盐为电子受体进行的。由于生丝微菌属是唯一能利用甲醇的反硝化细菌（见 17.14 节），因此利用这种方法可以从各种环境中筛选到该类细菌。

柄杆菌和有附属物的细菌（图 12.37 和图 12.41）是带有附属物的化能有机营养菌，附着于水环境中的植物或其他微生物上。尽管附属物的主要功能之一是附着，它们也极大地增加了细胞的表面积与体积的比值（柄杆菌表面积很大但几乎没有体积）。由第 4 章可知，小细胞如细菌，其表面积与体积比越高，越有利于细胞吸收营养并排出废物。带有附属物细菌（图 12.37）的独特形态可能是这些细菌进化适应营养较少的水域环境的生活阶段。

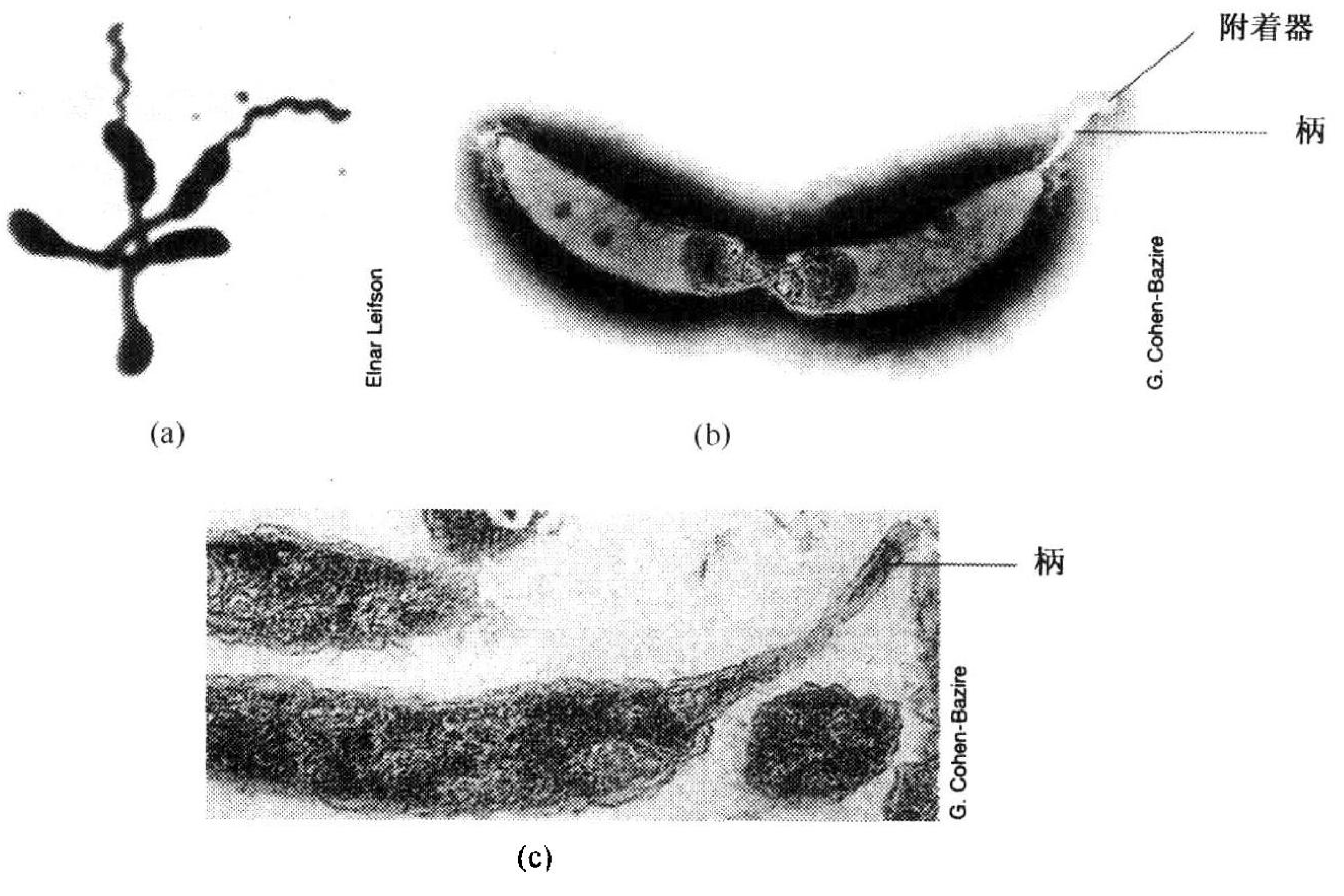


图 12.41　带柄细菌。（a）柄杆菌（Caulobacter）的玫瑰花环。单个细胞为 0.5μm。5 个细胞由它们的孢子囊柄连接（白叶）。有 2 个细胞已经开始分裂并且子细胞已经形成了鞭毛。（b、c）为有柄细菌柄杆菌属的电子显微镜照片。（b）一个分裂中的细胞负染制备物。（c）超薄切片。注意孢子囊柄区内有细胞质成分的存在。

这些附属物的另一个功能可能是降低水域环境的沉降率。实验表明：离心柄杆菌所需的离心力比没有附属器的细菌要大。这种内在的阻碍沉降的趋势可能与附属物相关，并可能是柄杆菌在其自然环境中的一个优势。由于这些微生物一般严格需氧，附属器可以避免细胞沉降到沉积物或其他缺氧环境，在那样的环境中它们将不能呼吸。

柄杆菌/带附属器细菌的选择分离可以通过制备很少营养的溶液，如 0.01%蛋白胨，并静置后得到。几天后形成一层含有附属器和柄细菌的表层膜。可在同样的琼脂培养基平板上划线进行分离。

柄杆菌属和嘉利翁氏菌属

两种常见的带附属器的细菌是柄杆菌属（图 12.41）和嘉利翁氏菌属（*Gallionella*）（图 12.43）。前者是化能有机营养型，产生一种充满胞质的柄状结构——附属物；后者是化能无机营养、铁氧化细菌，其柄是由铁氢氧化物组成。

经常在水域环境中见到带柄细菌，以及一些细胞的柄状结构形成纤毛漏斗（rosette）（图 12.41a）。在柄的末端是一个被称之为吸盘（holdfast）的结构，借此可以吸附到一个表面。柄杆菌细胞分裂循环（图 12.42）非常有趣，因为其含有不对称二分裂过程（unequal binary fission）。该菌作为细胞分裂及发育的模式生物已经进行了大量的分子生物学研究。细胞分裂经细胞的延伸后分裂，在柄的相反一端形成单一的鞭毛。具鞭毛的细胞形成，称为游动细胞（swarmer），从无鞭毛的母细胞脱离开来，四处游动，并在新的表面上固定下来，在鞭毛一极形成新的柄；鞭毛随即消失（图 12.42）。柄的形成是细胞分裂的必要先驱步骤，与 DNA 合成同步进行（图 12.42）。因此，柄杆菌的细胞分裂循环比简单的二分裂要复杂得多，带柄的和游走的细胞结构不同并且生长周期一定包括这两种形式。

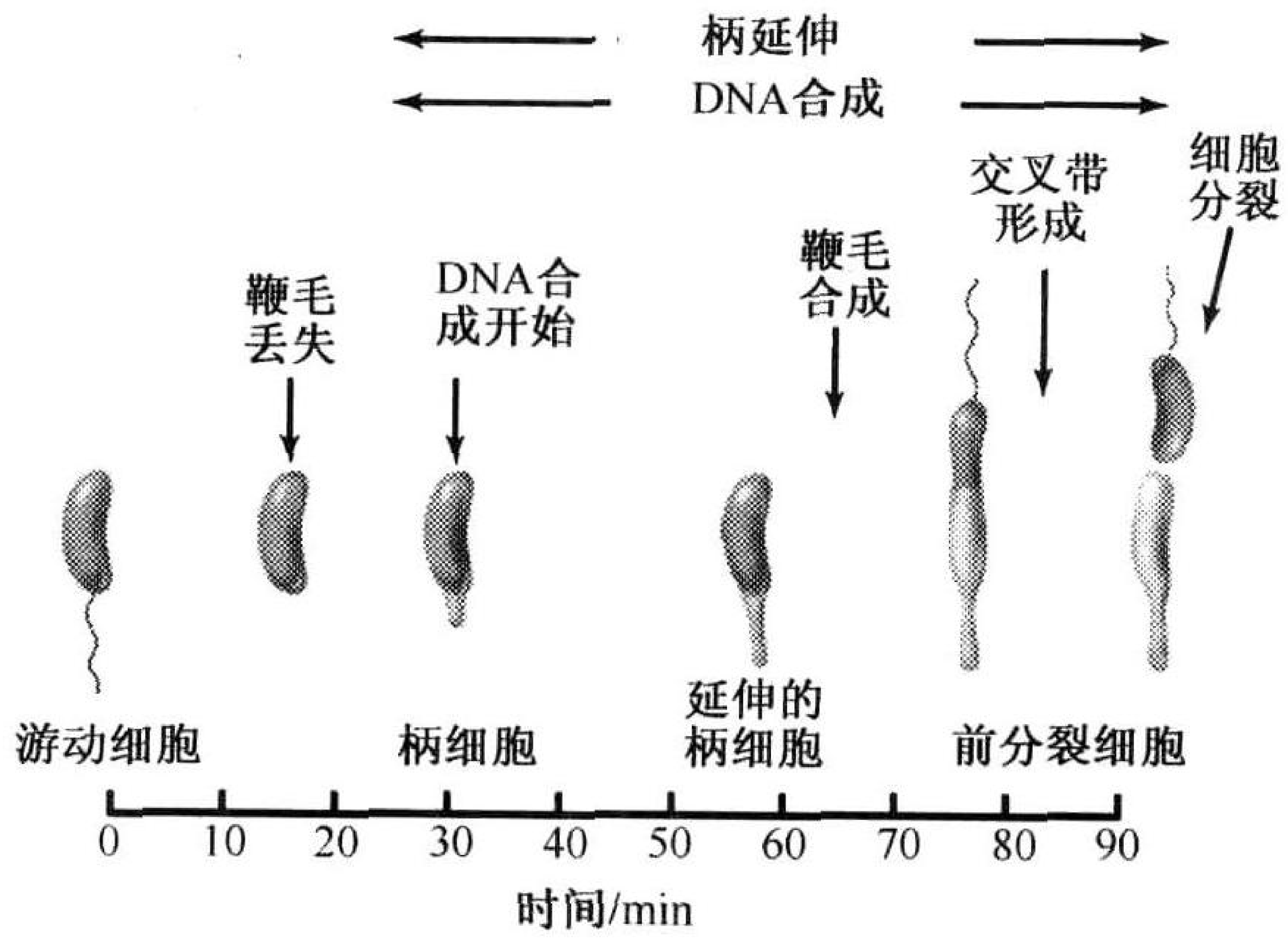


图 12.42　柄杆菌（*Caulobacter*）的生长。柄杆菌属细胞的循环周期开始于游动细胞。

嘉利翁氏菌属形成含有铁氢氧化物[$Fe(OH)_3$]的螺旋的柄状结构（图 12.43）。而其柄并不是细胞的一部分，仅是细胞表面分泌的物质。它含有铁氢氧化物聚集的有机基质。嘉利翁氏菌属在下水道、铁温泉和其他亚铁离子（Fe^{2+}）存在的水中很常见，通常与鞘细菌如球衣菌属有关。嘉利翁氏菌属是自养型化能无机营养菌，含有卡尔文循环所需要的酶类（见 17.6 节），它们以 Fe^{2+} 为电子供体将 CO_2 整合到细胞中。

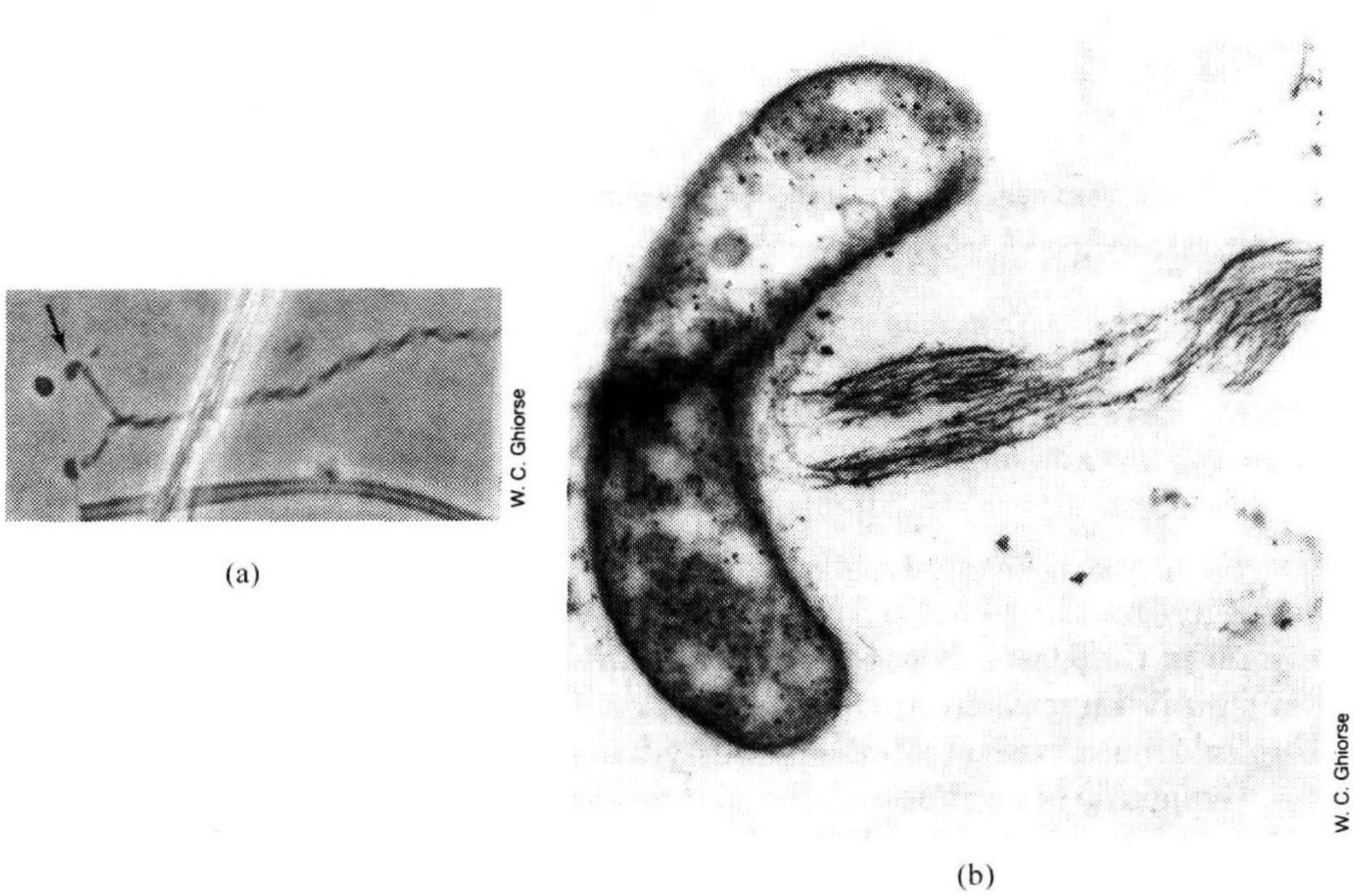


图 12.43　嗜中性铁离子氧化菌铁细菌，锈色嘉利翁氏菌（*Gallionella ferruginea*）的显微照片。（a）从纽约 Ithaca 附近铁渗漏区所得细胞的显微照片。注意从细胞中心发散出来的氢氧化铁螺旋式的柄形成的豆角形的细胞（箭头所示）。（b）超薄切片的透射电子显微照片。细胞约 0.6μm 宽。注意两张照片中从细胞中心发散出来的氢氧化铁螺旋式的柄。

概念检查

鞘细菌是丝状紫细菌，单个细胞形成长链，外层称为鞘。出芽菌体和具柄菌体是附属细胞，形成黏附或营养吸收所用的柄或杆，最初为水生。

◆ 从生理学上讲，鞘细菌纤毛菌属（*Leptothrix*）独特的地方是什么？

◆ 芽生细菌的分裂方式与二分裂有何不同？二分裂方式与柄杆菌属（*Caulobacter*）的分裂方式有何不同？

◆ 在缺乏营养的环境中柄杆菌有什么优势？

12.17 滑行黏细菌

代表属：黏球菌属（*Myxococcus*）、标桩菌属（*Stigmatella*）

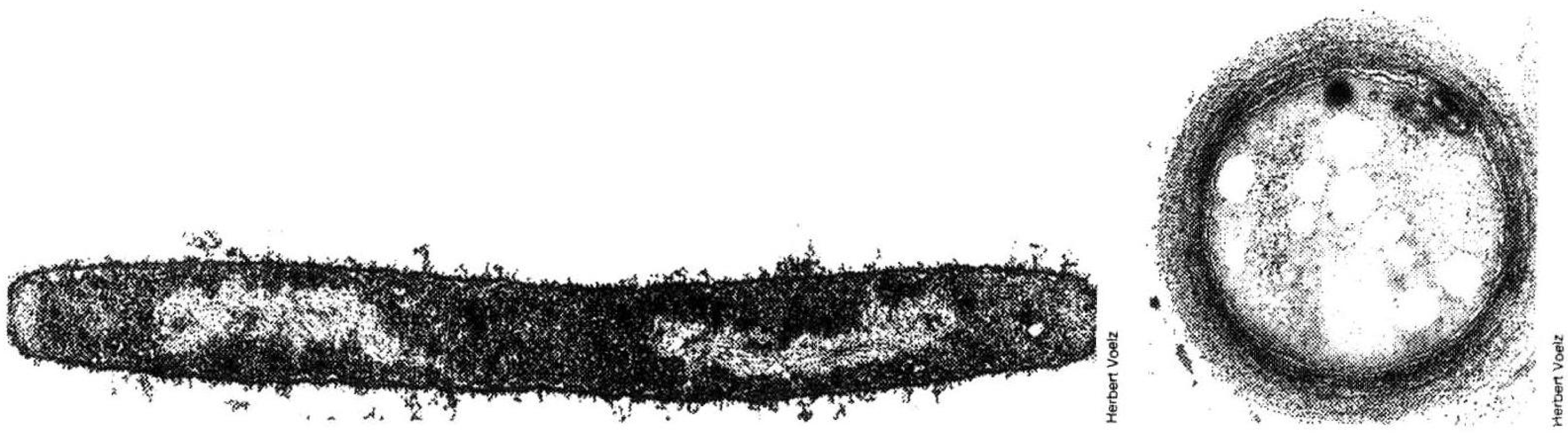
有多种细菌可以进行滑行运动（gliding）（见 4.15 节）。滑行微生物通常为长的棒状或丝状，缺少鞭毛，但在与固体表面接触时却可以运动。产孢黏细菌（*fruiting myxobactium*）是滑行细菌的一类，形成多细胞结构，叫做子实体（fruiting body），且具有复杂的生命周期，包括胞内交换（图 12.47）。从系统发育学上讲，滑行黏细菌是 δ 变形细菌的成员（表 12.20）。

表 12.20　带子实体的黏细菌的分类[a]

特征	属	DNA/(mol% GC)
锥形的营养细胞		
球形或椭圆形的黏孢子，子实体通常柔软和黏质，没有十分确定的孢子囊或柄	黏球菌属（*Myxococcus*）	(68～71)
杆状的黏孢子		
黏孢子不包含孢子囊，子实体没有柄	原囊菌属（*Archangium*）	(67～68)
黏孢子包含在细长的胞膜中		
子实体没有柄	孢囊杆菌属（*Cystobacter*）	(68)
柄状子实体，单孢子囊	蜂窝囊菌属（*Melittangium*）	(—)
柄状子实体，多孢子囊	标桩菌属（*Stigmatella*）	(68～69)
子实体是暗棕色的簇，由细小的球状或伴随一个外部细胞壁的孢子囊组成	囊球菌属（*Angiococcus*）	(—)
非锥形的营养细胞（平端，圆末端）；黏孢子聚集在营养细胞周围；通常产生孢子囊		
子实体没有柄；黏孢子呈杆状	多囊菌属（*Polyangium*）	(69)
子实体没有柄；黏孢子呈椭圆状；高度分解纤维素	堆囊菌属（*Sorangium*）	(—)
子实体没有柄；黏孢子呈球状	侏囊菌属（*Nannocystis*）	(70～72)
带柄的子实体	软骨霉状菌属（*Chondromyces*）	(69～70)

a. 这些种按照系统发生分类归入变形细菌的 δ 亚类（表 12.1）。

在所有已知的原核生物中，产孢黏细菌表现出最为复杂的生活史和行为模式。在保持这种复杂性的过程中，有些黏细菌的染色体可能会很大。例如，黄色黏球菌（*Myxococcus xanthus*），其染色体为环状，大小为 9.2Mb，是大肠杆菌的 2 倍（见 15.4 节和 10.19 节）。其实，这已经达到了酵母 16 条染色体的 2/3（见 15.6 节）。产孢黏细菌营养期的细胞是简单的、无鞭毛、革兰氏阴性杆菌（图 12.44），在表面上可以滑动，通过使其他细菌裂解来获得主要的营养。在适当的条件下，一团营养细胞聚集构成子实体，其中有些细胞转变为休眠结构，称为黏孢子（myxospore）（图 12.44b）。



(a)　　　　(b)

图 12.44　黏球菌（*Myxococcus*）。（a）黄色黏球菌（*M. xanthus*）营养细胞薄切片的电子显微照片。细胞宽 0.75μm。（b）黄色黏球菌的黏孢子，显示多层壁。黏孢子直径约为 2μm。

子实体

黏细菌的子实体从一团简单的松散球状黏孢子团变成一个具有子实体壁和茎的复杂

形态（图 12.45）。子实体通常具有鲜艳的颜色并且在形态学上进行了描述（图 12.45 和图 12.46）。通常用放大镜或解剖显微镜在腐败的木头或植物材料上都可以看到它们。黏细菌的子实体经常在潮湿的粪便上孵育几天后生长（如绵羊或兔子的粪便）。

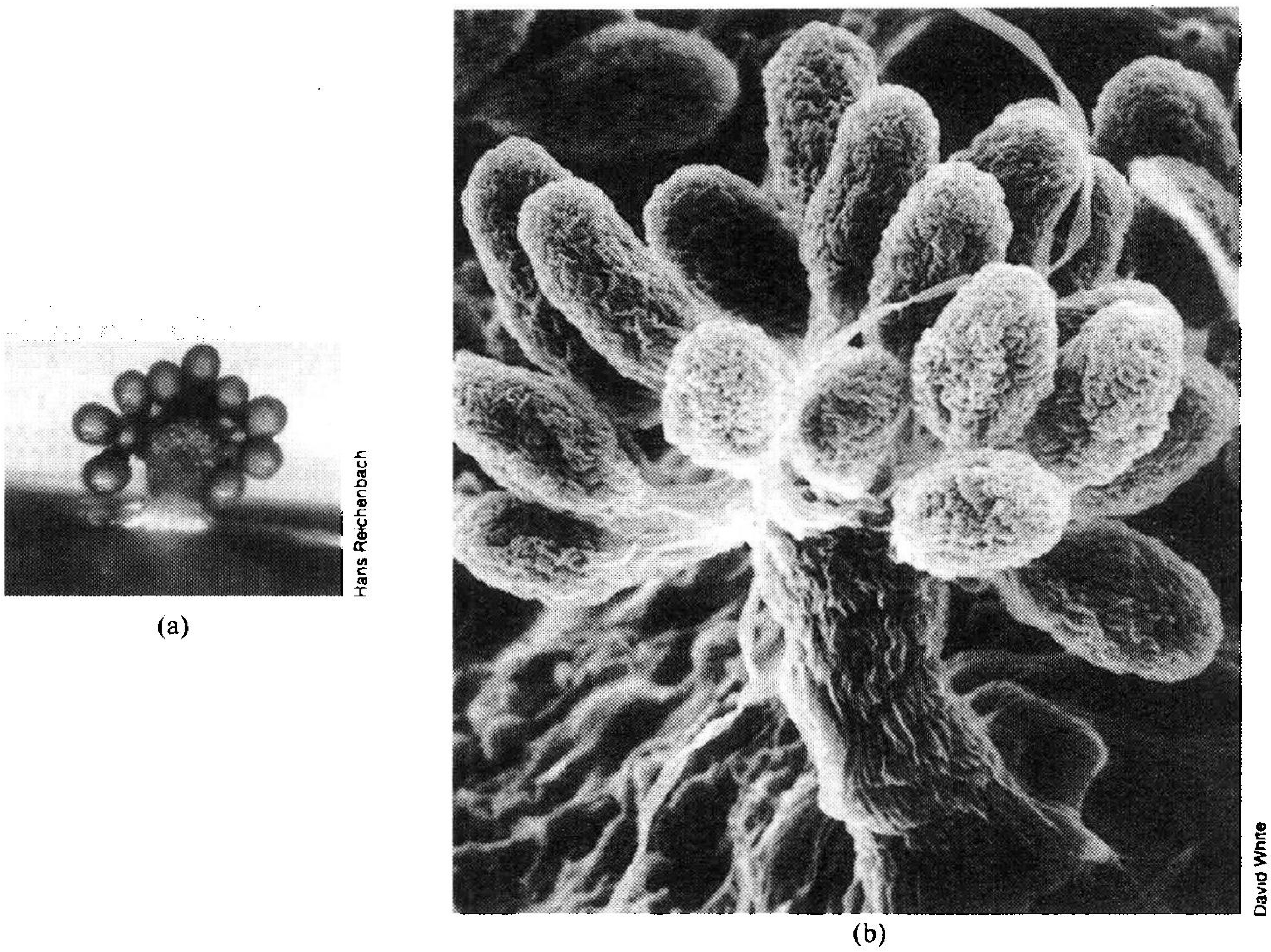


图 12.45　橙色标桩菌（*Stigmatella aurantiaca*）。（a）单个子实体的彩色照片。结构约 150μm 高。（b）子实体的扫描电镜照片，它生长于一片木头上。注意在每个子实体结构中可见的单个的细胞。（a）中子实体的颜色是由于其产生了类胡萝卜素（见 17.3 节）。

另外一种分离黏细菌的方法，就是准备一些只含有水和琼脂的平板（1.5%琼脂溶于蒸馏水中，不加营养物），在平板上铺些能被黏细菌裂解作为其营养物的浓菌液。在平板的中心放少量土壤或腐败的树皮或其他的天然材料。接种源中的黏细菌裂解细胞，并且以细胞中储存的物质作为营养；当它们生长后，它们将从接种源位置向四周蔓延堆集。几天至一周后，用解剖显微镜可以观测到平板上黏细菌子实体团。从子实体或菌团的边缘把细胞转接到有机培养基上，就可得到纯的培养物。在实验室条件下，许多黏细菌可以在含有蛋白胨或酪蛋白水解物的培养基上生长。它们可以利用氨基酸或小肽作为有机养分。这类生物是典型的具有完整的柠檬酸循环（图 5.22）和细胞色素系统的好氧菌。

产孢黏细菌的生活史

图 12.47 给出了一个典型的产孢黏细菌的生活史。营养体细胞通常会分泌黏液，并且在它经过一个固体表面后，会留下一条黏液的痕迹（图 12.48）。这条痕迹被菌团中其他的细胞优先利用，很快建立起一个特别的传导模式，并且一些细胞沿着黏液的痕迹

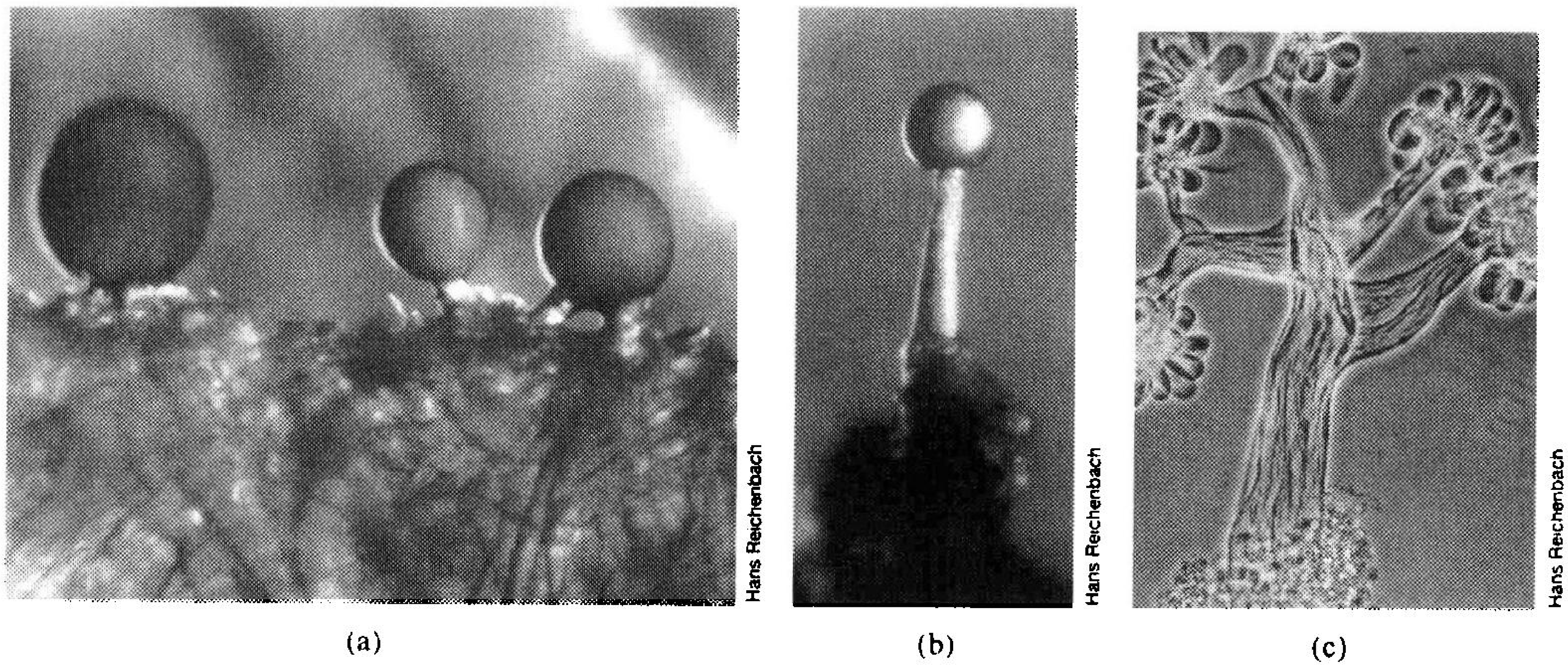


图 12.46 产孢黏细菌 3 个种的子实体。（a）橙色黏球菌（*Myxococcus fulvus*）（高约 125μm）。（b）有柄黏球菌（*Myxococcus stipitatus*）（高约 170μm）。（c）藏红花软骨霉状菌（*Chondromyces crocatus*）（高约 560μm）。

迁移（图 12.48）。最后形成的子实体（图 12.45 和图 12.46）是一个由不同细胞组成的，分为茎部和含有黏孢子的头部的复杂结构。

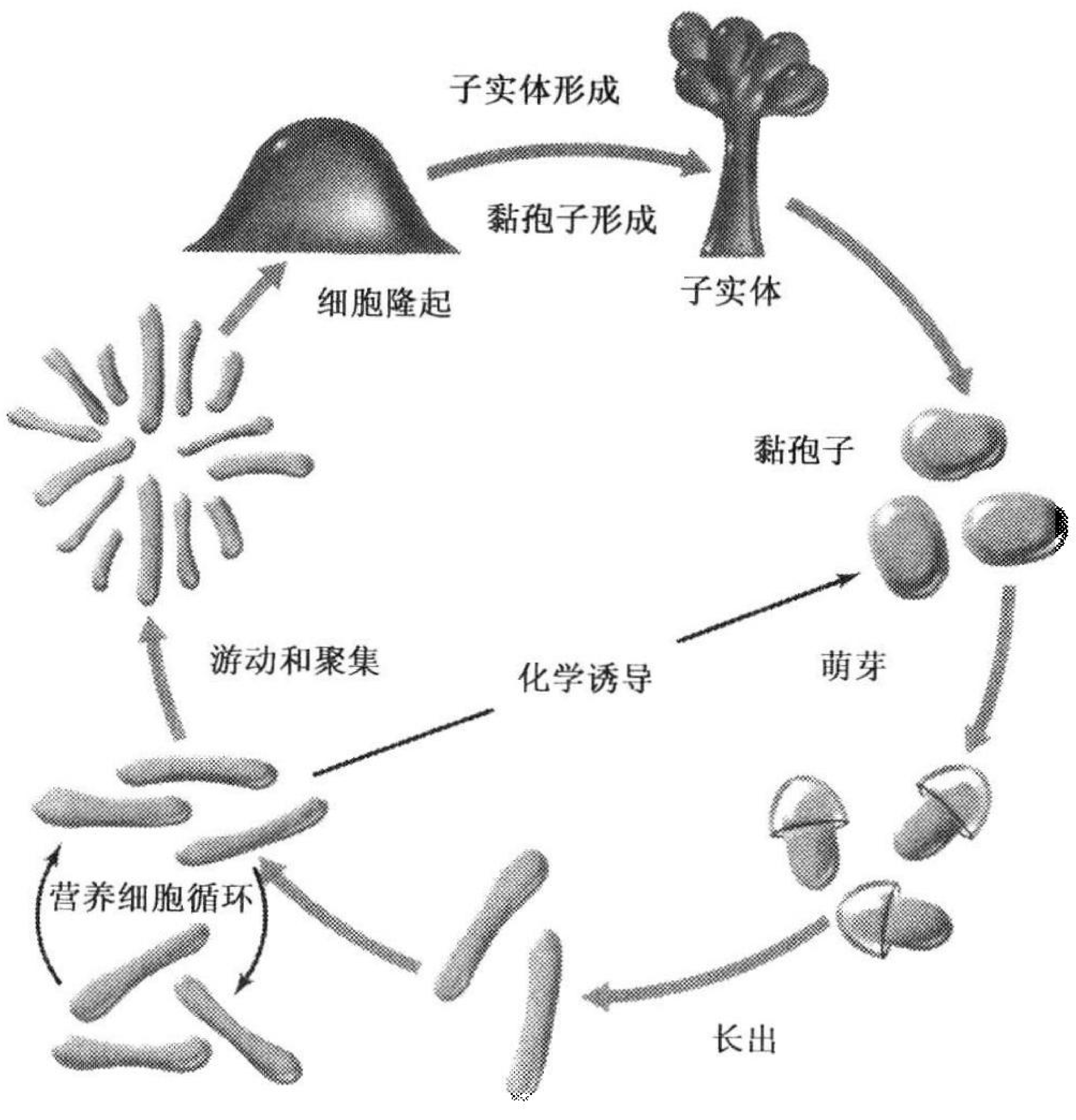


图 12.47 黄色黏球菌（*Myxococcus xanthus*）的生活周期。聚集作用使营养体细胞形成子实体。营养体细胞向休眠结构黏孢子的形态建成。后者在适宜的营养和生理条件下萌发成为营养细胞。营养细胞在某种化学诱导物作用下，最显著的是高浓度的甘油，直接变为黏孢子，而不用形成子实体。见图 12.45 和图 12.46 中黏球菌子实体的照片。

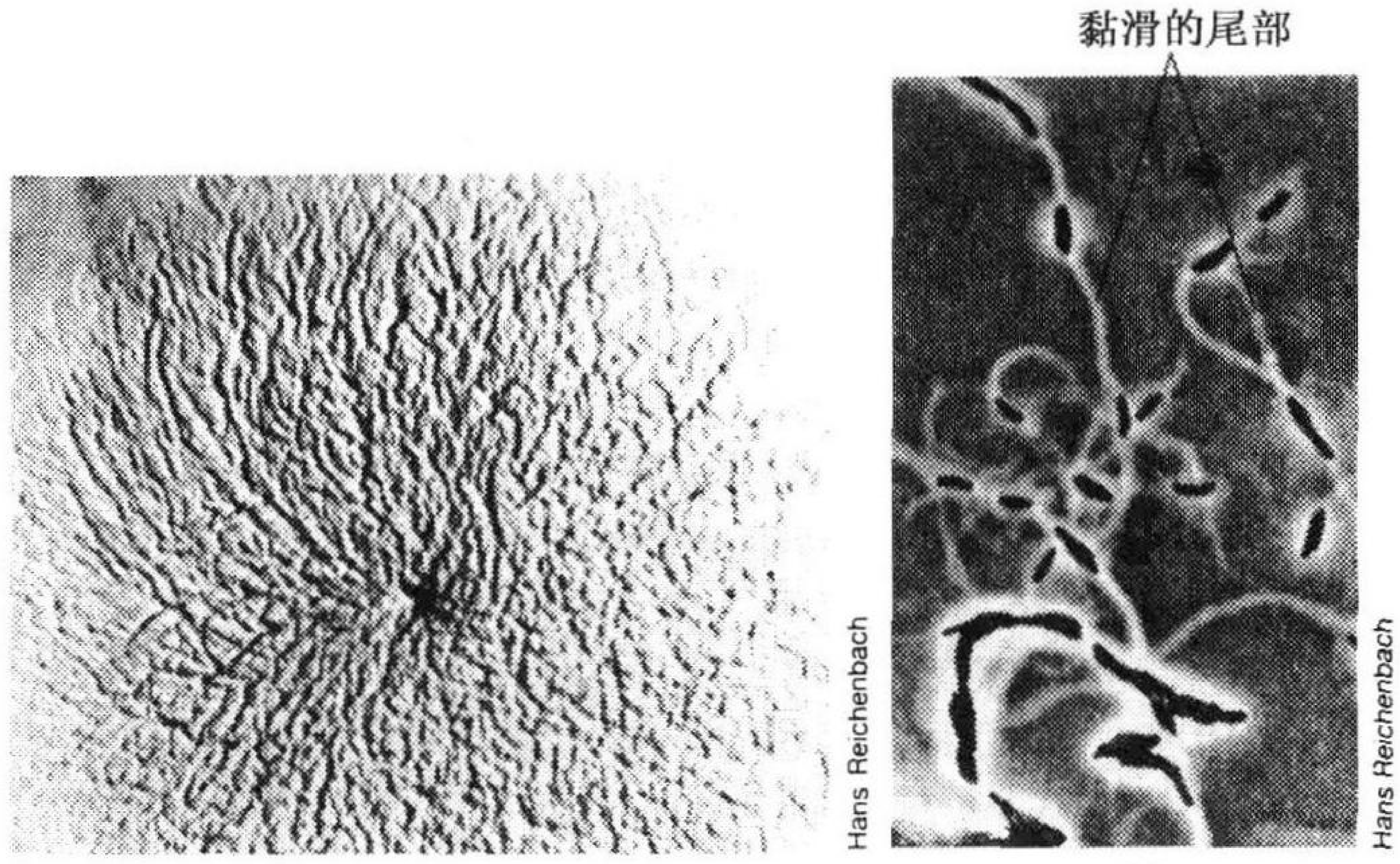


图 12.48　游动的黏球菌（*Myxococcus*）。（a）黄色黏球菌（*Myxococcus xanthus*）在琼脂上游动的菌落显微照相（直径为 5mm）。（b）活跃的滑行培养物，橙色黏球菌（*Myxococcus fulvus*）的单个细胞（直径约为 0.8μm），表示琼脂上有特异的黏液痕迹。

只要营养体生长期间营养充足，就不会形成子实体；但是当营养物耗尽时，营养体细胞开始产孢。细胞聚集在一起，也许是通过趋化性反应（见 4.16 节和 8.13 节），细胞相互朝着对方的方向移动，形成一团（图 12.49）。一个子实体可以含有 10^9或更多细胞。当细胞堆积得比较高时，子实体开始分化为茎部和头部（图 12.49b、c）。图 12.49d 清楚地显示了子实体分化成头和茎的过程。茎是由一些细胞吸附在一起，被黏液包裹构成的。大多数细胞是积累在子实体的头部，分化成黏孢子（图 12.44～12.47）。有些属的黏孢子是被一种大的壁状结构包裹起来，称之为胞囊（cyst）。

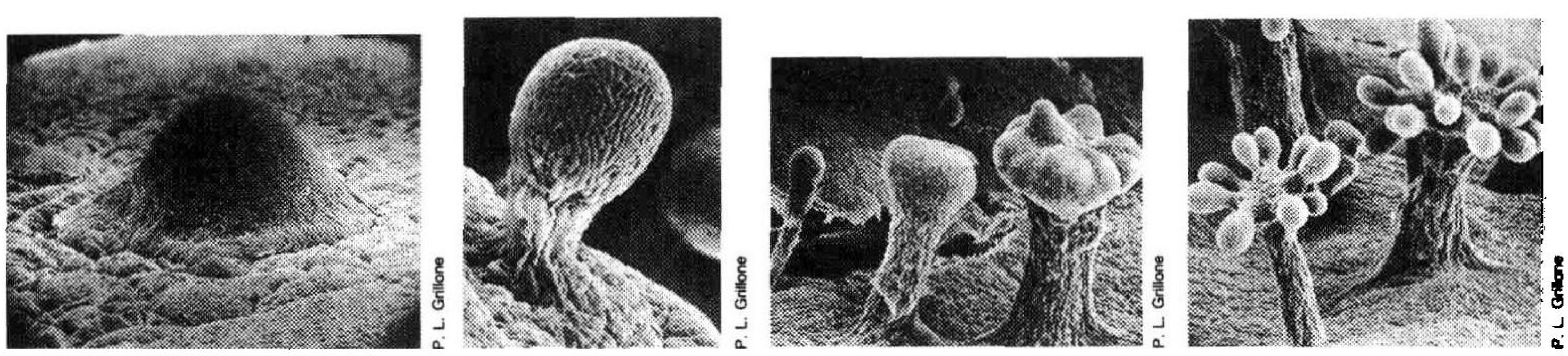


图 12.49　藏红花软骨霉状菌（*Chondromyces crocatus*）子实体形成过程的扫描电子显微照相。（a）早期，显示聚集和细胞团的形成。（b）茎形成的开始阶段。头部黏液的形成还未开始，因此组成头部的细胞仍然可看到。（c）头部形成的 3 个阶段，注意茎的直径也在增加。（d）成熟的子实体，整个子实体的高度约 700μm（图 12.46c）。

与营养期细胞比起来，黏孢子对干旱、超声波、紫外线、热有更好的抵抗力；但耐热的程度要低于细菌的内生芽孢（见 4.13 节）。因此包裹于胞囊中的黏孢子其主要功能是使微生物在分散出去后或在干旱的生境中存活下来。当分散到适宜的环境或有充足的生长条件时，胞囊破裂，最终黏孢子萌发，生成一个新的营养体细胞。

黏细菌通常染有类胡萝卜素的颜色（图 12.45a 和图 12.46），主要是类胡萝卜素糖苷。色素的形成是由光激发的，其中至少有一个功能就是光保护作用。因为在自然界中，黏细菌通常会在光照中形成子实体，所以有光保护色素的出现就很容易理解了。在标桩菌属（*Stigmatella*）（图 12.45）中，光可以显著地激发子实体的形成，并催化脂外激素 2，5，8-三甲基-8-羟基-壬烷（2，5，8-trimethyl -8-hydroxy-nonane-4-one）的形成。该物质可以启动细胞聚集步骤的进行。产孢黏细菌主要以营养细胞形态学，黏孢子和子实体的结构上的特点为依据进行分类（表 12.20）。在系统遗传学上，利用 rRNA 测序进行分类。

概念检查

黏细菌呈棒状、滑行细菌，聚集形成复杂的细胞团称为子实体。黏细菌是化能有机营养土壤菌，利用有机物质或其他的细菌细胞为生。

◆ 什么样的环境条件可以促使黏细菌子实体的形成？

◆ 什么是黏孢子？与内生孢子相比如何？

◆ 黏细菌属于哪种特殊生理家族？

12.18 硫酸盐还原菌及硫还原菌

代表属：脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）、脱硫杆菌属（*Desulfobacterium*）、脱硫单胞菌属（*Desulfomonas*）

在缺氧的环境中 δ 变形细菌中一大类的细菌可利用硫酸盐（SO_4^{2-}）和硫（S^0）作为终电子受体并以有机化合物或 H_2 作为电子供体。H_2S 是 SO_4^{2-} 和 S^0 的还原产物。目前已知的 40 多个属的微生物共分为异化型硫酸盐还原菌（sulfate-reducing bacteria）和硫还原菌（sulfur-reducing bacteria），主要成员见表 12.21。

表 12.21 硫酸盐还原菌和硫还原菌的特性[a]

属	特性	DNA/(mol%GC)
类群Ⅰ硫酸盐还原菌：不能氧化乙酸盐		
脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）	极生鞭毛，弯曲杆菌，无芽孢；革兰氏阴性；含有脱硫绿胺霉素；其中一种为嗜热的	46～61
脱硫微菌属（*Desulfomicrobium*）	运动杆菌，无芽孢；革兰氏阴性；无脱硫绿胺霉素；	52～57
脱硫香肠样杆菌属（*Desulfobotulus*）	弧形；革兰氏阴性；可运动；无脱硫绿胺霉素	53
脱硫棒菌属（*Desulfofustis*）	运动杆菌；专门降解乙醇酸盐和乙醛酸	56
脱硫肠状菌属（*Desulfotomaculum*）	垂直或弯曲杆菌，通过缘毛或极生鞭毛运动；革兰氏阴性，无脱硫绿胺霉素，产生内孢子；一种可以乙酸盐为能量来源	37～46
脱硫念珠菌属（*Desulfomonile*）	杆菌；能够将 3-氯苯甲酸酯经还原脱氯作用还原为苯甲酸酯（见 17.18 节）	49

续表

属	特性	DNA/(mol%GC)
类群Ⅰ硫酸盐还原菌：不能氧化乙酸盐		
脱硫橄榄样菌属（*Desulfobacula*）	卵圆形细胞，海洋生；可氧化各种芳香族化合物包括芳香族硫氢甲苯为 CO_2	42
古生球菌属（*Archaeoglobus*）	古生，高温型，最适生长温度为 83℃，含有一些甲烷营养菌所特有的辅酶，生长时产生少量甲烷；H_2、甲酸、糖、乳酸和丙酮酸是电子供体，SO_4^{2-}、$S_2O_3^{2-}$ 或 SO_3^{2-} 为电子受体（见 13.7 节）	41～46
脱硫叶菌属（*Desulfobulbus*）	卵圆形或柠檬形细胞；无芽孢；革兰氏阳性；不含有脱硫绿胺霉菌；可通过单极生鞭毛运动（如果能够）；可利用丙酸为电子供体，产物为乙酸盐和 CO_2；	59～60
脱硫管状菌属（*Desulforhopalus*）	弯曲杆菌，气状液泡；嗜冷；可利用丙酸、乳酸或乙醇作为电子供体	48
嗜热脱硫杆菌属（*Thermodesulfobacterium*）	小的，革兰氏阴性杆菌；存在脱硫绿胺霉素；嗜热，最适生长温度为 70℃；虽为细菌，但却含有醚键磷脂	34
类群Ⅱ硫酸盐还原菌：能氧化乙酸盐		
脱硫菌属（*Desulfobacter*）	杆菌；无芽孢，革兰氏阴性；无脱硫绿胺霉素；如果可以运动是通过单极生鞭毛；只利用乙酸盐为电子供体并通过柠檬酸循环将其氧化为 CO_2	45～46
脱硫杆菌属（*Desulfobacterium*）	杆菌；有些含气泡，海洋生，通过乙酰 CoA 途径可营自养生长	41～59
脱硫球菌属（*Desulfococcus*）	球形细胞；不运动；革兰氏阴性；存在脱硫绿胺霉素，无芽孢；利用 C_1 到 C_{14} 脂肪酸作为电子供体并完全氧化为 CO_2；可通过乙酰 CoA 途径营养生长	57
脱硫线菌属（*Desulfonema*）	大的，丝状滑行细菌；革兰氏阳性；无芽孢；有或无脱硫绿胺霉素；可利用 C_2 到 C_{12} 脂肪酸作为电子供体并完全氧化为 CO_2；通过乙酰 CoA 途径营养生长（H_2 为电子供体）	35～42
脱硫八叠球菌属（*Desulfosarcina*）	细胞成堆积状（八叠球菌状的排列）；革兰氏阴性；无芽孢；无脱硫绿胺霉素；可利用 C_2 到 C_{12} 脂肪酸作为电子供体并完全氧化为 CO_2；可通过乙酰 CoA 途径营养生长（H_2 为电子供体）	51
Desulfoarculus	弧形；革兰氏阴性；可运动；无脱硫绿胺霉素，可利用 C_1 到 C_{18} 的脂肪酸作为电子供体	66
脱硫状菌属（*Desulfacinum*）	球形或卵圆形细胞，革兰氏阴性；可利用 C_1 到 C_{18} 脂肪酸，营养型多种多样，可以自养生长；嗜热	64
杆状脱硫状菌属（*Desulforhabdus*）	杆菌，无芽孢；革兰氏阴性，不运动；可利用脂肪酸并将其完全氧化为 CO_2	52
热硫还原杆菌属（*Thermodesulforhabdus*）	革兰氏阴性可运动杆菌；嗜热，可利用 C_{18} 以下的脂肪酸	51

续表

属	特性	DNA/(mol%GC)
异化的硫还原菌		
脱硫单胞菌属（*Desulfuromonas*）	直杆菌，单侧鞭毛，无芽孢；革兰氏阴性；不还原硫酸盐；乙酸盐、琥珀酸、乙醇或丙酮都可作为电子供体，专性厌氧，其中一个种能还原三氯乙烯的氯（见17.18节）	50～63
硫还原菌属（*Desulfurella*）	可运动短杆菌；革兰氏阴性；需要乙酸盐；嗜热	31
硫磺单胞菌属（*Sulfurospirillum*）	小的弧状；可利用 H_2 或甲酸盐为电子供体还原 S^0	—
弯曲杆菌属（*Campylobacter*）	弯曲，弧形杆菌，极生鞭毛；革兰氏阴性，无芽孢；不能还原硫酸盐但可还原硫、亚硫酸盐、硫代硫酸盐、硝酸盐或延胡索酸盐，利用乙酸盐或一系列其他碳源或电子供体厌氧生长；兼性好氧	40～42

a. 从系统发育学上看，大多数硫酸盐还原菌和硫还原菌属于 δ 变形细菌。

Ⅰ类中的硫酸盐还原菌如脱硫弧菌属（图 12.50a）、脱硫单胞菌属、脱硫肠状菌属（*Desulfotomaculum*）和脱硫叶菌属（*Desulfobulbus*）（图 12.50c），可利用乳酸、丙酮酸、乙醇或某些脂肪酸作为电子供体，将硫酸盐还原为硫化氢。Ⅱ类中如脱硫菌属（*Desulfobacter*）（图 12.50d）、脱硫球菌属（*Desulfococcus*）、脱硫八叠球菌属（*Desulfosarcina*）（图 12.50e）和脱硫线菌属（*Desulfonema*）（图 12.50b），它们的特别之处是可以氧化脂肪酸，尤其是乙酸盐（acetate），并将硫酸盐还原为硫化物。硫酸盐还原菌大都是专性厌氧的，因此对它们的培养要运用严格的无氧技术（图 12.50g）。

硫酸盐还原菌广泛存在于由微生物分解作用造成的缺氧的水陆环境之中。最著名的是脱硫弧菌属（图 12.50a），它通常生活在含有丰富有机物质和高含量硫酸盐的水或有积水的土壤中。从系统发育学上讲，脱硫肠状菌属于革兰氏阳性菌，是在土壤中发现的内生芽孢杆菌。这种菌在罐头食品中生长并还原硫酸盐而导致食物腐败，称为硫化物恶臭。其他种类的硫酸盐还原菌是无氧淡水（Ⅰ类）或海洋（Ⅰ和Ⅱ类）中的土著菌群；偶尔可从哺乳动物的肠道内分离到。

硫还原作用

异化型硫酸盐还原菌能够将硫还原为硫化物但不能还原硫酸盐。脱硫单胞菌属中的许多成员（图 12.50f）能够通过偶联乙酸或乙醇的氧化作用（oxidation）而将元素硫还原为 H_2S。然而，还原元素硫的能力与还原其他硫化物如硫代硫酸盐、硫醚或二甲基亚砜（DMSO）的能力一样，是许多化能有机营养菌的性质，一般来说它们都是兼性厌氧的［如变形菌属（*Proteus*）、弯曲杆菌属（*Campylobacter*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）和沙门氏菌属（*Salmonella*）］。脱硫单胞菌与之有所不同，它是专性厌氧菌且只能利用硫作为电子受体（表 12.21）。异化性硫还原菌如脱硫单胞菌属与硫酸盐还原菌的居住环境相同，经常与氧化 H_2S 为 S^0 的细菌如绿硫细菌（见 12.32 节）建立联系。产生的硫在硫还原代谢中被还原成 H_2S，完成简略的缺氧硫循环（见 19.13 节）。

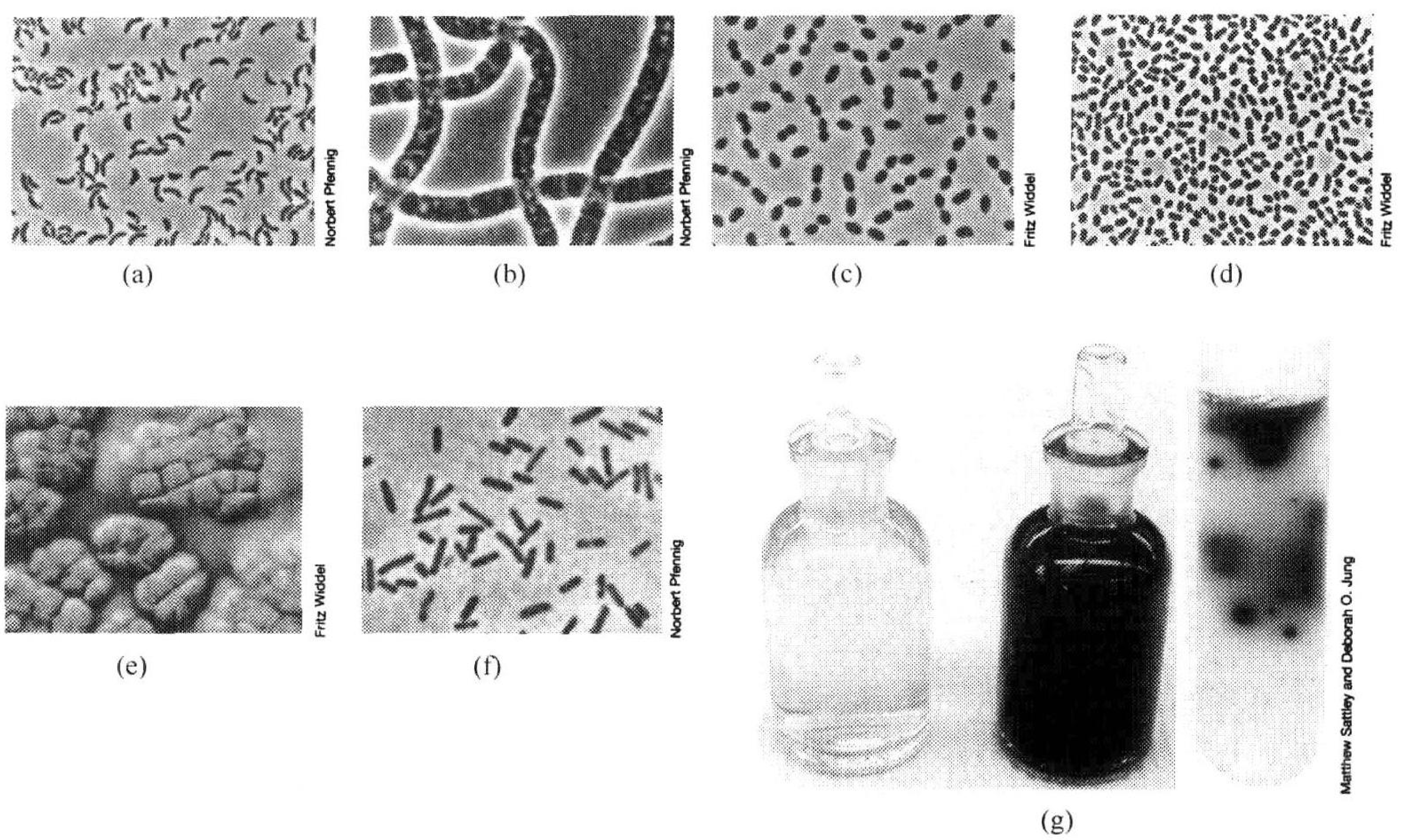


图 12.50　硫酸盐还原菌（a～e）和硫还原菌（f）的相差显微照片。（a）脱硫弧菌（*Desulfovibrio desulfuricans*），细胞直径约为 0.7μm。（b）居泥脱硫线菌（*Desulfonema limicola*），细胞直径为 3μm。（c）丙酸脱硫菌（*Desulfobacter propionicus*），细胞直径约为 1.2μm。（d）波氏脱硫菌（*Desulfobacter postgatei*），细胞直径约为 1.5μm。（e）可变脱硫八叠球菌（*Desulfosarcina variabilis*）相差干扰显微照片，细胞直径约为 1.25μm。（f）乙酸氧化脱硫单胞菌（*Desulfuromonas acetoxidans*），细胞直径约 0.6μm。（g）硫酸盐还原菌的富集培养。左边为无菌培养基；中间为出现黑色硫化亚铁（FeS）的阳性富集物；右边为“摇管”中的硫酸盐还原菌的克隆。

硫酸盐还原菌的生理学

硫酸盐还原菌所能利用的电子供体的范围较广。H_2、乳酸和丙酮酸都较为常用，有许多Ⅰ类的菌还能利用苹果酸、磺酸盐和某些特殊醇类（如乙醇、丙醇和丁醇）。有些脱硫肠状菌属的菌株可以利用葡萄糖，但并不多见。Ⅰ类硫酸盐还原菌可将其电子供体氧化为乙酸盐并作为其最终的分泌产物。

Ⅱ类与Ⅰ类的细菌在氧化脂肪酸、乳酸、琥珀酸等的能力上有所不同，某些种甚至能将安息香酸盐完全氧化为 CO_2。脱硫八叠球菌、脱硫线菌属、脱硫球菌属、脱硫菌属、脱硫肠状菌属和一些特殊的脱硫弧菌属，在利用 H_2 为电子供体，硫酸盐为电子受体并以 CO_2 为唯一碳源生长的能力上很独特。少量专性硫酸盐还原菌可以利用碳氢化合物甚至原油作为电子供体。该过程很引人注目，因为在发现这些微生物之前，人们认为碳氢化合物只能在有氧条件下被氧化（见 17.23 节）。

除了利用硫酸盐作为电子受体外，许多硫酸盐还原菌还可以利用硝酸盐作为电子受体，将 NO_3^- 还原为 NH_3，或还原硫酸盐如羟乙基磺酸盐（$HO—CH_2—CH_2—SO_3^-$）为硫。元素硫也可被大多数硫酸盐还原菌还原为硫化氢。

某些有机化合物可被硫酸盐还原菌发酵。最常见的发酵化合物为丙酮酸，经磷酸裂解反应变为乙酸、CO_2和 H_2（图 17.51）。而且，尽管硫酸盐还原菌被认为是严格厌氧，某些从微生物形成的膜上分离的、与产氧蓝藻共生的菌株，具有极强的耐氧能力，可利用 O_2作为电子受体。至少发现脱硫弧菌属中的一个种微氧脱脱弧菌（*Desulfovibrio oxyclinae*），可以在微氧条件下利用氧气作为电子受体来生长。

分离

在无氧的乳酸盐-硫酸盐并添加了亚铁离子的培养基上可相对容易地富集脱硫弧菌。另外还需要添加巯基乙醇或抗坏血酸作为还原剂以获得低 E_0'。当硫酸盐还原菌生长时，由硫酸盐还原作用得到的硫化物与亚铁离子结合形成黑的不溶性亚铁硫化物（图 12.50g）。变黑并不仅表明硫酸盐的还原作用，而且也表明铁与硫化物结合并解毒，从而得到较高的细胞产量。当培养基变黑，证明菌体已经生长，通过在内层含有薄琼脂的试管或在培养皿划线于无氧箱中进行纯化（图 6.26）。

另外，还可以用振荡琼脂试管进行纯化。这种振荡试管的方法是：将少量的原始富集液加入装有已溶化的琼脂生长培养基的试管中，充分混匀，再用培养基系列稀释（见 18.2 节和图 18.3b）。固体纯化是从平板上长出的黑色菌落（图 12.50g）中挑取单菌落重复划线分离直到获得纯培养为止。

概念检查

硫酸盐还原菌和硫还原菌属于变形细菌的 δ 类群，在厌氧条件下还原 SO_4^{2-} 和 S^0 为 H_2S。已知的硫酸盐还原菌有两个亚类：Ⅰ类，不能够将乙酸盐氧化为 CO_2；Ⅱ类，可以将乙酸盐氧化为 CO_2。

◆ 从自然界中富集并分离Ⅱ类硫酸盐还原菌时使用何种培养基?

◆ 对于化能无机营养和自养硫酸盐还原菌的生长：①电子供体是什么？②电子受体是什么？③细胞碳源是什么?

◆ 从生理学上讲，脱硫单胞菌属与脱硫弧菌属有何不同?

Ⅲ 门 2 和门 3：革兰氏阳性菌和放线菌

12.19 不形成芽孢、低 GC 含量、革兰氏阳性菌：乳酸菌及其相关细菌

代表属：葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、微球菌属（*Micrococcus*）、链球菌属（*Strepyococcus*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）和八叠球菌属（*Sarcina*）

在本章的介绍中，我们发现革兰氏阳性菌可以分成两大类，低 GC 含量和高 GC 含量（放线菌属）。在这一节中我们所讨论的属都是低 GC 含量的。微球菌属尽管应该属于放线菌，但是它在形态学上与葡萄球菌属非常相似，在这里我们也将一起讨论。这一

部分还包括乳酸细菌，典型的革兰氏阳性的杆菌和球菌（表 12.22）。

表 12.22 主要的革兰氏阳性球菌的鉴别特征

属	游动性	细胞排列	发酵生长	DNA/(mol%GC)	发育类群[a]	其他特征
微球菌属（*Micrococcus*）	−	簇生，四联体	−	66～73	放线菌	严格好氧
葡萄球菌属（*Staphylococcus*）	−	簇生，对生	+	30～39	低 GC 含量	唯一在细胞壁中含有磷壁酸的属
口腔球菌属（*Stomatococcus*）	−	簇生，对生	+	56～60	放线菌	唯一含有荚膜的属
动性球菌属（*Planococcus*）	+	对生，四联体	−	39～52	低 GC 含量	主要生于海洋中
八叠球菌属（*Sarcina*）	−	8 个或多个细胞立方叠堆	+	28～31	低 GC 含量	极度耐酸；细胞壁中含有纤维素
瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）	+	对生，链生	+	39～46	低 GC 含量	专性厌氧；生长于许多动物的瘤胃、盲肠和大肠中
消化球菌属（*Peptococcus*）	−	簇生，对生	+	50～51	低 GC 含量	专性厌氧；发酵蛋白胨而不发酵糖类
消化链球菌属（*Peptostreptococcus*）	−	群生，短链生	+	28～37	低 GC 含量	专性厌氧；发酵蛋白胨；人类皮肤、肠道、阴道的正常菌群；也可以从阴道分泌物和化脓性分泌物中分离到

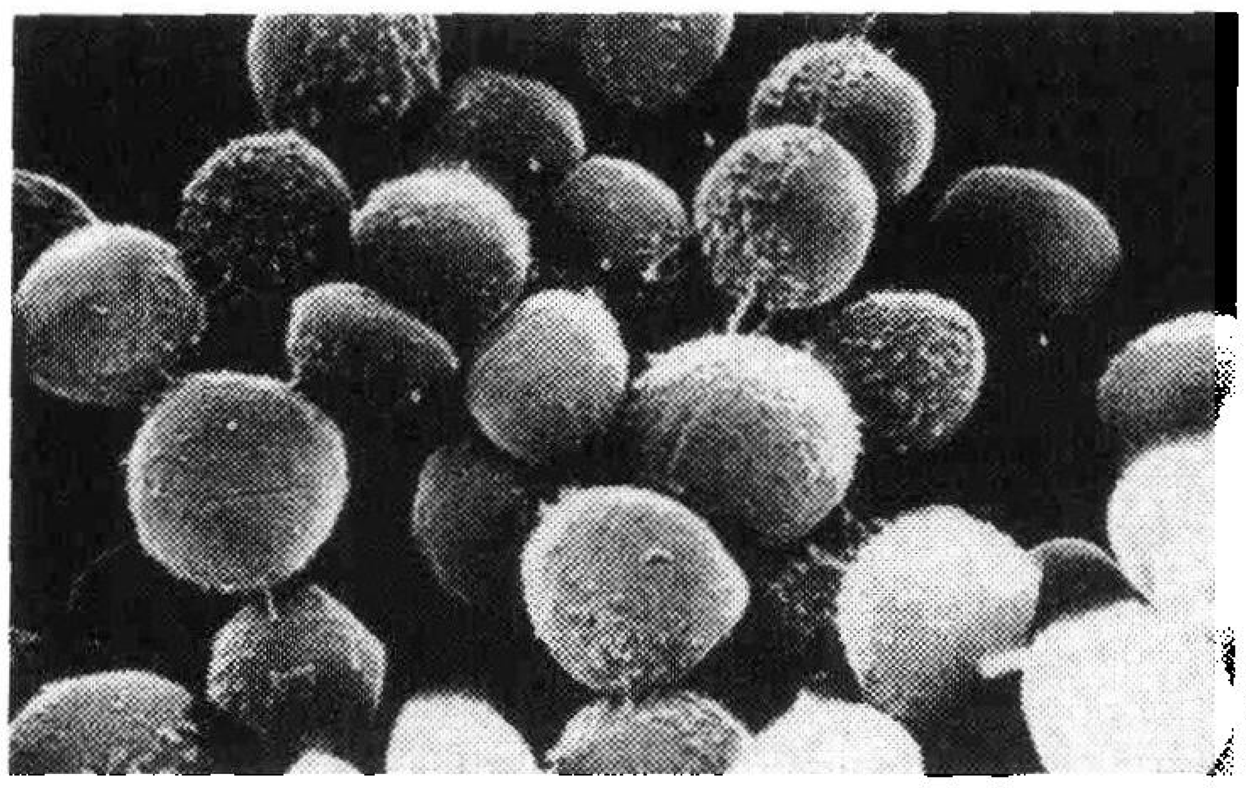
a. 所有的细菌都是革兰氏阳性菌（图 12.1）。

葡萄球菌属和微球菌属

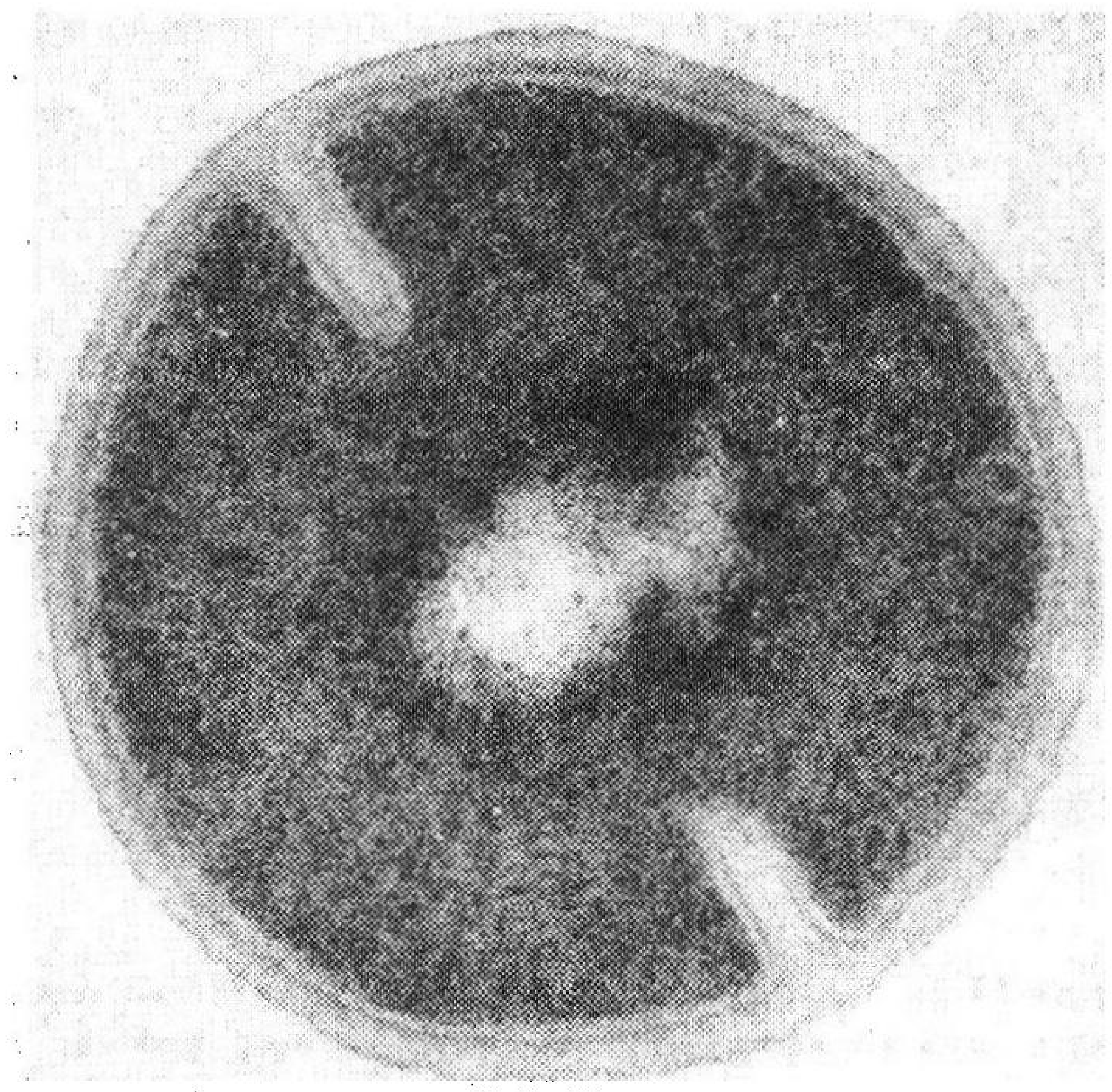
葡萄球菌属（图 12.51）和微球菌属都是具有典型的呼吸代谢的好氧细菌。二者都能够发生过氧化氢酶反应，这是它们区别于链球菌属和其他一些革兰氏阳性球菌的地方。革兰氏阳性球菌对于水分丧失具有相当强的抵抗潜力，可以忍受干燥和高盐的环境。它们能够在高盐培养基中生长，这为菌种分离提供了一个简单的方法。例如，把菌种涂布在含有 7.5%NaCl 的丰富培养基平板上，经过有氧培养，革兰氏阳性球菌常常会形成优势菌群。这些菌落通常带有色素，这为对革兰氏阳性球菌进行筛选又提供了依据。

葡萄球菌属和微球菌属通过氧化发酵实验很容易加以区分（O/F）（表 24.3）。微球菌是一种专性好氧菌，只能够有氧分解葡萄糖产生酸，而葡萄球菌是一种兼性好氧菌，可以在有氧、无氧条件下分解葡萄糖产生酸。葡萄球菌属形成的细胞簇是典型的（图 12.51a），而微球菌属则不典型。

葡萄球菌是人类和动物的常见寄生菌，偶尔会引起严重的感染。在人类中葡萄球菌主要有两类：一类是表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*），是皮肤或黏膜表面的不产色素、非病原性的细菌；另一类是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）（图 12.51），它们可以产生黄色色素，大多数与病理条件有关，包括丘疹、肺炎、骨髓炎、脑膜炎和关节炎。在 12.21 节中讨论金黄色葡萄球菌，在 12.26 节和 12.29 节中讨论葡萄球菌引起的疾病。微球菌可以从皮肤中分离出来，但它们更多的是存在于无生命的物体、灰尘颗粒和土壤中。



(a)

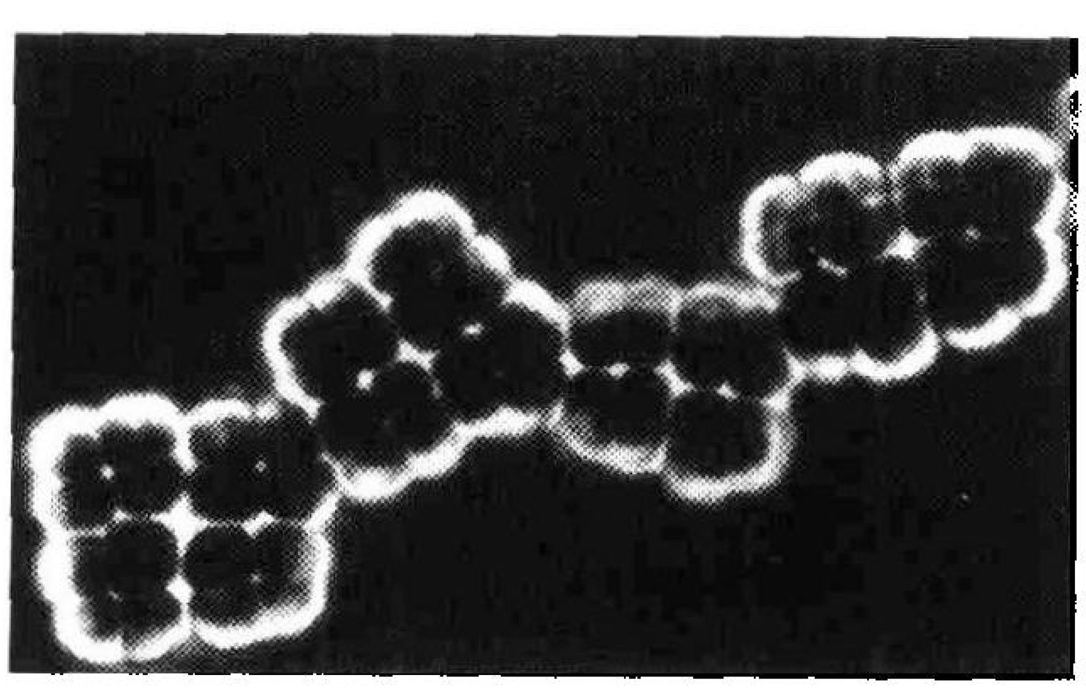


(b)

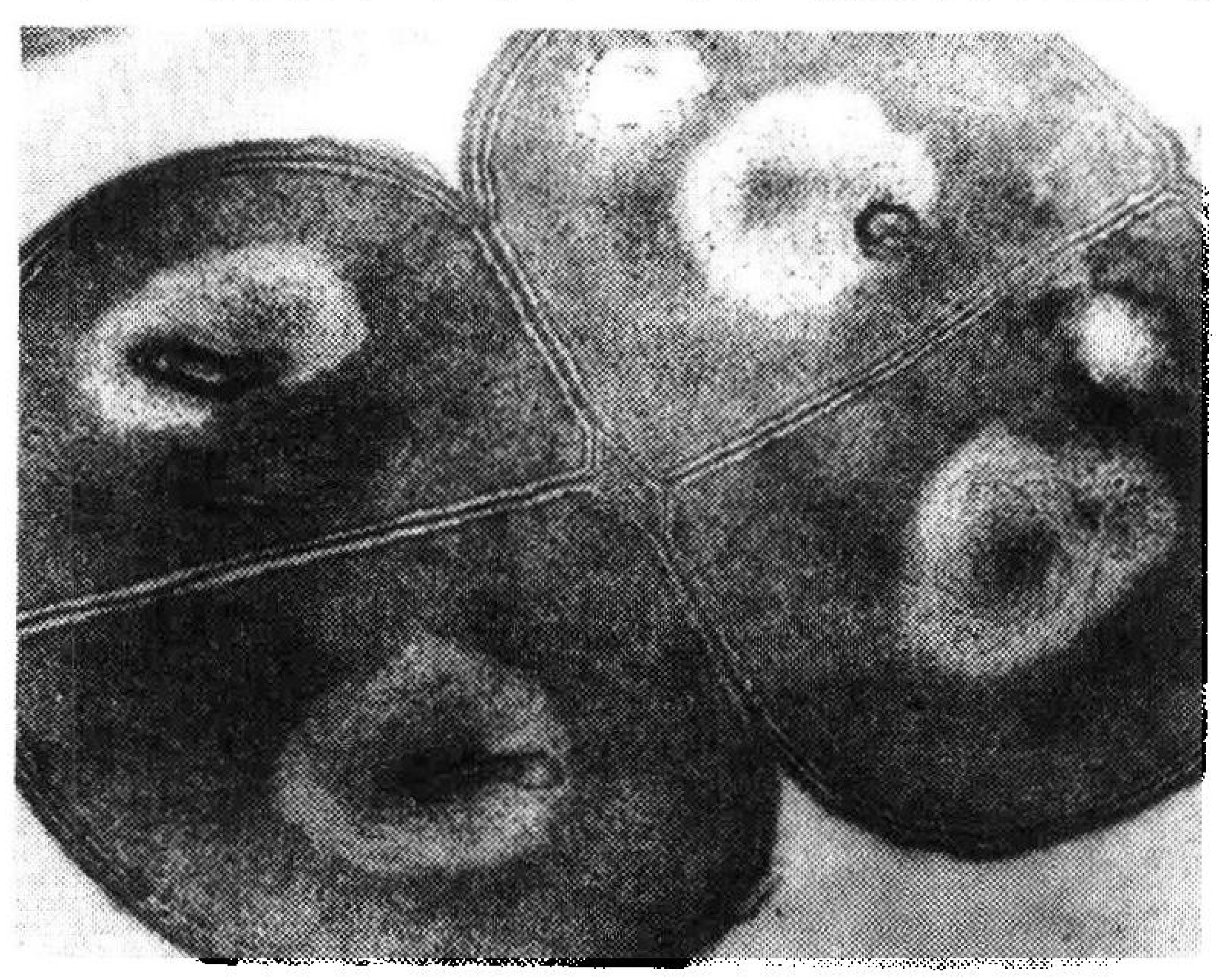
图 12.51 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)。(a) 典型的葡萄球菌属的扫描电镜照片，图中表明了细胞簇的不规则排列，单细胞直径大约为 0.8μm。(b) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 单细胞的透射电镜照片。可以看到厚厚的革兰氏阳性细胞壁 (见 4.8 节)。

八叠球菌属

八叠球菌属包括的细菌，可以在 3 个垂直的平面上进行分裂，产生有 8 个或更多个细胞组成的细胞叠堆 (图 12.52a)。八叠球菌是专性好氧菌，它们可以忍受极酸的环境，可以发酵糖类并能在低至 pH2 的条件下生长。其中的一个种，心室八叠球菌 (*Sarcina ventriculi*) 在其细胞壁的周围生有一层厚厚的、由纤维素组成的纤维层 (图 12.52b)。相邻细胞的纤维层相连，就像水泥一样把心室八叠球菌细胞的叠堆固定住。从土壤、淤泥、粪便和胃溶物中可以分离得到八叠球菌。由于心室八叠球菌可以忍受强酸环境，它是少数几种可以生长于人类和其他单胃动物胃中的细菌之一。在人处于某种胃肠病理状况时 (如幽门溃疡)，食物被阻滞不能流向肠道时，可以观察到心室八叠球



(a)



(b)

图 12.52 八叠球菌属 (*Sarcina*)。(a) 典型的革兰氏阳性球菌八叠球菌属的相差显微照片。单细胞直径大约为 2μm。(b) 超薄切片的电镜照片，细胞的最外层由纤维素组成。

菌在胃中的快速生长。

乳酸细菌和乳酸发酵

乳酸细菌是革兰氏阳性的杆菌和球菌，可以产生乳酸作为主要的或唯一的发酵产物。这一类细菌缺乏卟啉和细胞色素，不能进行电子传递磷酸化，所以只能通过底物水平磷酸化作用（substrate-level phosphorylation）获得能量。所有乳酸细菌都是厌氧生长，但是不同于许多厌氧菌的是，大多数乳酸细菌对 O_2 并不敏感，在有氧或无氧条件下都能生长，因此它们是耐氧的厌氧细菌（aerotolerant anaerobe）。大多数乳酸细菌只通过糖类和有关的可发酵化合物的代谢获得能量，因此常常在有糖类存在的地方生长。乳酸细菌一般只有有限的生物合成能力，它们需要许多营养，包括氨基酸、维生素、嘌呤和嘧啶（表 5.4）。

乳酸细菌的种之间的一个重要差别是其糖类发酵产物的特征，一类叫同型发酵（homofermentative），只产生一种发酵产物——乳酸（lactic acid）；另一类叫异型发酵（heterofermentative），产生其他产物，主要有乙醇（ethanol）与 CO_2，以及乳酸（表 12.23）。在图 12.53 中列出了同型发酵和异型发酵细菌葡萄糖发酵的简要途径。发酵产物的不同点是由是否存在醛缩酶（aldolase）决定的，这是糖酵解（glycolysis）反应中的一个关键酶（图 5.14）。异型发酵菌缺乏醛缩酶，不能把二磷酸果糖裂解为磷酸丙糖，然而它们能够把 6-磷酸葡萄糖氧化为 6-磷酸葡萄糖酸，然后将之脱羧成为磷酸戊糖，磷酸戊糖再通过磷酸转酮酶（phosphoketolase）分解成磷酸丙糖和乙酰磷酸（图 12.53）。

在异型发酵菌中，磷酸丙糖最终转化为乳酸并产生 1mol ATP。然而，为了平衡氧化还原反应，乙酰磷酸接受生成磷酸戊糖时产生的 NADH 的电子，转化成乙醇但不生成 ATP。因此异型发酵菌利用葡萄糖只生成 1mol 的 ATP，而同型发酵却产生 2mol ATP。由于异型发酵菌将 6-磷酸葡萄糖脱羧，会产生 CO_2 作为发酵产物，而同型发酵菌只产生少量 CO_2 或者不产生 CO_2，因此在实验室培养条件下一种简便的检出异型发酵菌的方法就是观察其 CO_2 的产量。

乳酸细菌的不同属已经在细胞形态学、DNA 碱基组成、系统发育学、发酵代谢类型等方面得到鉴定，在表 12.23 中已经列出。链球菌属、肠球菌属（*Enterococcus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）、明串珠菌属（*Leuconostoc*）和片球菌属（*Pediococcus*）具有比较相似的 DNA 碱基组成比例，而且菌株与菌株之间的差别也非常小。但是乳杆菌属却不同，该属的菌株 DNA 的组成差别很大，不能形成一个均一的类群。

表 12.23　乳酸菌代表属的区别[a]

细胞形状和排列	属	DNA/(mol%GC)
球菌成链或四联体		
同型发酵	链球菌属（*Strepyococcus*）	(34～46)
	肠球菌属（*Enterococcus*）	(38～40)
	乳球菌属（*Lactococcus*）	(38～41)
	片球菌属（*Pediococcus*）	(34～42)

续表

细胞形状和排列	属	DNA/(mol%GC)
球菌成链或四联体		
异型发酵	明串珠菌属（*Leuconostoc*）	(38～41)
杆菌，典型链状		
同型发酵	乳杆菌属（*Lactobacillus*）	(32～53)
异型发酵	乳杆菌属（*Lactobacillus*）	(34～53)

a. 系统发育学上，所有的菌株都是革兰氏阳性菌中低GC含量革兰氏阳性亚类。

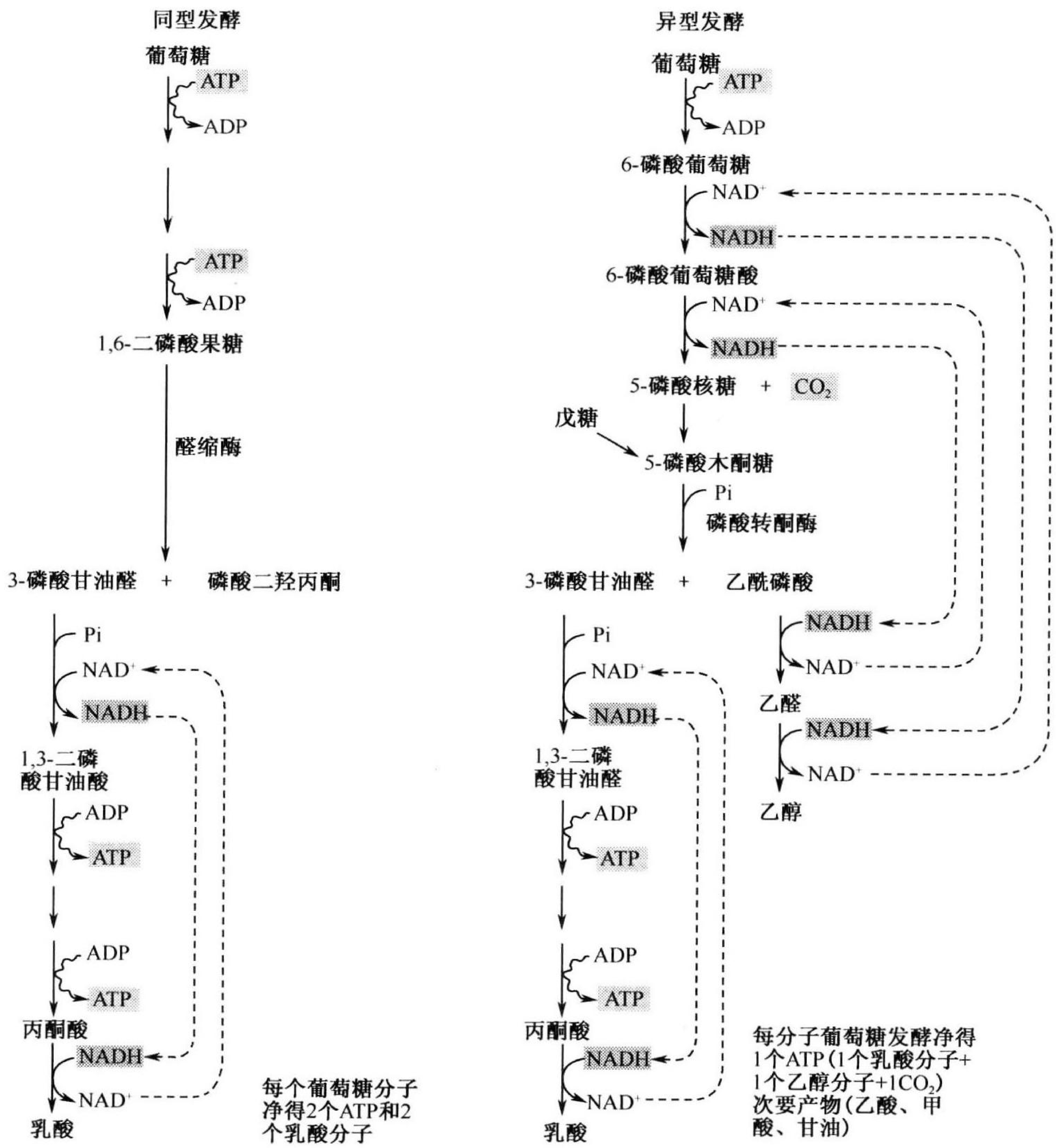


图 12.53 同型发酵和异型发酵乳酸细菌的葡萄糖发酵过程。注意：在生成乙醇发酵过程中不产生 ATP。如果有 O_2 存在，许多异型发酵的乳酸细菌可以通过 NADH 重新利用 O_2（使用黄素酶作为中间媒介物），产生水，进而产生乙酸，代替了乙醇，这个过程产生了 1 个 ATP。

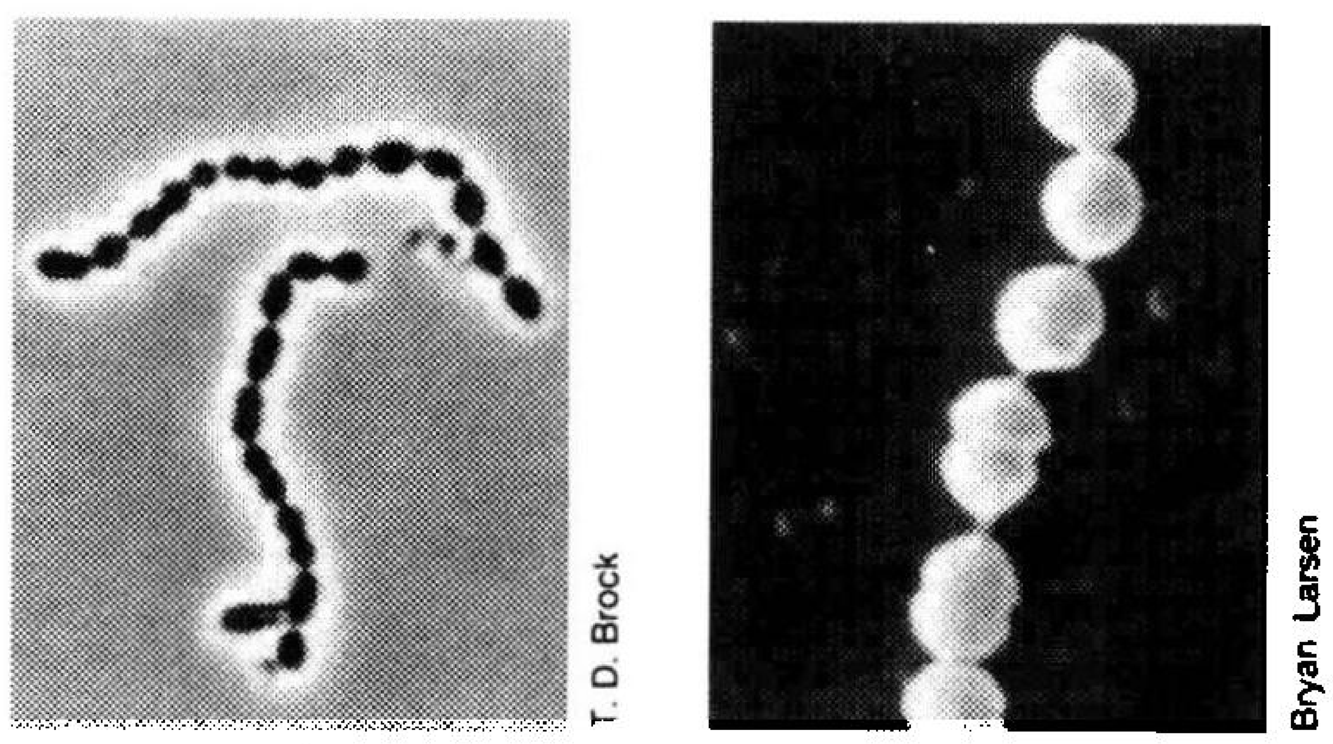
链球菌属和其他球菌

链球菌属（图12.54）包括了许多生活于不同环境的不同菌种，它们的活动对人类有很大的影响。一些菌株对人和动物是致病性的（见26.2节）。作为乳酸生产菌，某些链球菌在乳制品、青贮饲料和其他发酵产品的生产中发挥着重要的作用（见29.2节），有些还在龋齿的形成中起作用（见21.3节）。为了对链球菌中的人类致病菌和非致病菌进行区别，链球菌被分成了3个属。乳球菌属包括与乳品生产有关的链球菌，而肠球菌属（*Enterococcus*）则主要包括与粪便产生有关的链球菌。

表12.24　链球菌、乳酸菌和肠球菌的主要差别

种	抗原种类	代表种群	在血琼脂上的溶血类型	最适生长温度 10℃	最适生长温度 45℃	60℃存活30min	生长在含有1%甲基蓝的牛奶	生长在含有40%胆汁的肉汤中	生长环境
链球菌(Streptococci)									
化脓(Pyogenes)亚群	A、B、C、F、G	化脓链球菌(*Strepyococcus pyogenes*)	溶血(β)	−	−	−	−	−	呼吸途径系统性的
草绿色(Viridans)亚群	−	变形链球菌(*Strepyococcus mutans*)	绿色化(α)	−	+	−	−	−	口腔，肠内
肠球菌(Enterococci)	D	粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)	溶血(β)绿色化(α)或无	+	+	+	+	+	肠内，阴道植物体
乳球菌(Lactococci)	N	乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)(图12.54a)	无	+	−	+	+	+	植物体，日常用品

链球菌属的菌株在某些特征上又分成两个相关的类群，表12.24中列出了这些特征。对其进行划分的一个重要特征是其在血琼脂上的溶血作用。那些产生链球菌溶血素O或S的菌株的菌落周围包围着一个大的红细胞溶血区域，叫做β溶血作用（β-hemolysis）（图21.17a）。许多链球菌、乳球菌和肠球菌不产生溶血素，但是它们在血琼脂上的菌落周围也会形成绿色或棕色的区域，这种现象并不是真正的溶血作用，而是由红细胞的脱色作用和其中的钾元素的丢失造成的。这种类型的反应被称为α溶血作用（α-hemolysis）。



(a)　(b)

图12.54　革兰氏阳性链球菌属（*Strepyococcus*）的相差（a）和电子扫描（b）照片。 (a) 乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*）。(b) 链球菌属，细胞直径均为0.5～1μm。

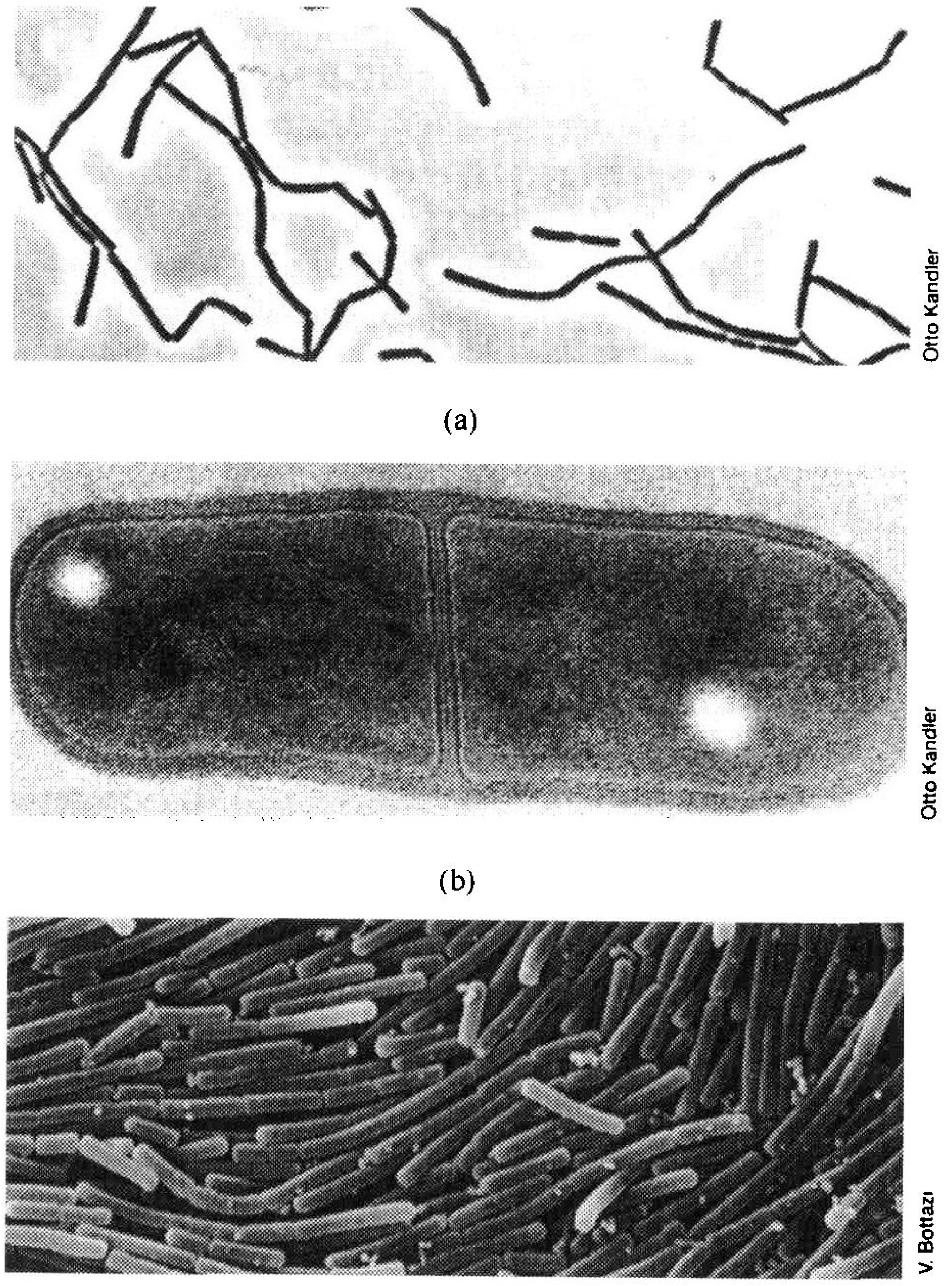
链球菌和相关球菌也可以根据特定的糖抗原分成不同的免疫学组。这些抗原组（或称为兰斯斐尔德组，这是以链球菌分类学中

的先驱 Rebecca Lancefied 命名的）是以字母划分的，目前已经确定出了 A～O。那些在人类中发现的β溶血链球菌常常带有 A 组抗原。而肠球菌属带有 D 组抗原。B 组抗原的链球菌一般与动物有关，可以引起奶牛的乳房炎（mastitis），也与人类的感染有关。乳球菌属于 N 组抗原，是非致病性的。

明串珠菌属（*Leuconostoc*）是一类在形态学上与链球菌相似的球菌，但是它们是异型发酵。明串珠菌属的菌株也可以分解柠檬酸产生有香味的成分，双乙酰和 3-羟基丁酮，它们被用作乳品发酵中的引子（菌体接种物）。一些明串珠菌属的菌株在蔗糖中培养时可以产生大量的葡聚糖多糖（α-1,6-葡聚糖）（图 17.64）。明串珠菌生产的葡聚糖具有一些医学用途，可作为血浆代用品。明串珠菌属的其他菌株产生的多聚糖有称之为果聚糖的果糖聚合物。

乳酸杆菌属

乳酸杆菌是典型的杆状，从细长杆状到短的弯曲杆状变化（图 12.55）。绝大多数



(c)

图 12.55　乳杆菌属（*Lactobacillus*）的相差和电子显微镜照片。（a）嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*），细胞宽约为 0.75μm。（b）短乳杆菌（*L. brevis*）透射电子显微照相，细胞大小为 0.8μm×2μm。（c）德氏乳杆菌（*L. delbrueckii*）的扫描电子显微照相，细胞直径为 0.7μm。乳酸菌属所有同型发酵和异型发酵的种都已了解（表 12.23 及图 12.53）。

为同型发酵，也有些异型发酵（表 12.23）。乳酸杆菌是乳制品中的常见菌，而且有些菌株被用于发酵乳品的制备上。例如，德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*）（图 12.55c）被用于保加利亚酸奶的制备，嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）（图 12.55a）用于酸奶的生产，其他一些种用于生产泡菜、青贮饲料和酸菜（见 29.2 节）。乳杆菌属通常比其他乳酸细菌对酸性条件的抗性要强，在 pH4 时生长良好。因此可用 pH 为酸性的含有碳水化合物的培养基从天然材料中分离出来，如番茄汁-聚蛋白胨琼脂。

乳酸杆菌的耐酸性是，它们能在天然的乳酸发酵过程中连续生长，而且是在 pH 下降到别的乳酸菌不能生长时仍能生长，因此乳酸杆菌负责乳酸发酵的最后阶段。乳酸杆菌很少致病，甚至不致病。

李斯特氏菌属

李斯特氏菌属（*Listeria*）是趋向于形成 3～5 个细胞串的革兰氏阳性球杆菌（图 29.9）。李斯特氏菌在系统发育上与乳杆菌属的细菌相关，同时，像同型发酵的乳酸细菌一样，它们可以利用葡萄糖产酸，但是不产气。事实上，真正的乳酸菌是在严格缺氧和代谢酶不存在的情况下都能够生长。相反，李斯特氏菌要在微氧或完全有氧并且代谢酶存在的情况下才能生长。

尽管已知李斯特氏菌属的许多种，但单核细胞增生李斯特氏菌（*L. monocytogenes*）才是最有价值的，因为它能引起一种食源性疾病——李氏杆菌病（Listeriosis）（见 29.10 节和图 29.9）。微生物传播到被污染的，通常是即食的食物（奶酪是最常见的载体），从而使慢性的疾病发展为严重的脑膜炎。

12.20 形成内生芽孢、低 GC 含量、革兰氏阳性菌：芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属及其相关细菌

代表属：芽孢杆菌属（*Bacillus*）、梭菌属（*Clostridium*）、芽孢八叠球菌（*Sporosarcina*）和阳光细菌（*Heliobacteria*）

通过形态学、形成芽孢的位置（图 12.56）和 O_2 的关系及能量代谢，已经对众多形成内生芽孢的细菌进行了研究（表 12.25）。细菌结构和抗热性，随着内生芽孢的形

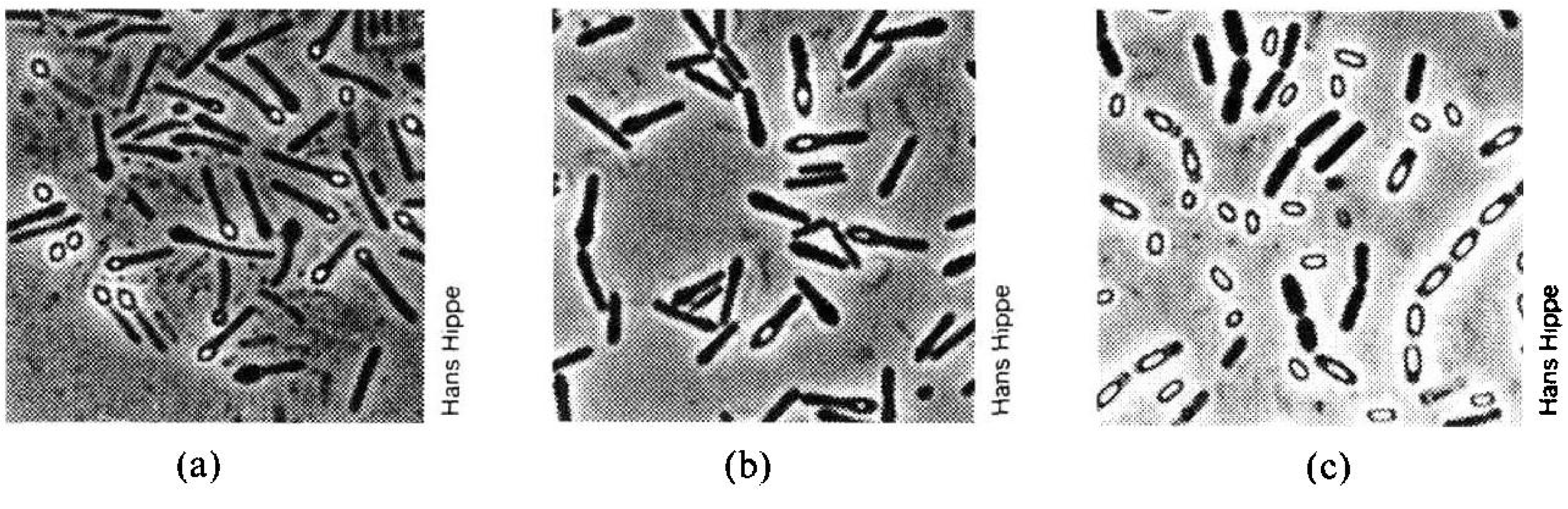


图 12.56　梭菌属（*Clostridium*）的不同种的相差光学显微照片，表示内生芽孢的不同位置。（a）尸毒梭菌（*Clostridium cadaveris*），末端芽孢，细胞宽约 0.9μm。（b）生芽孢梭菌（*Clostridium sporogenes*），亚末端芽孢，细胞宽约为 1μm。（c）双酶梭菌（*Clostridium bifermentans*），中生芽孢，细胞宽约为 1.21μm。

成，将在 4.13 节中进行讨论。所有的内生芽孢形成菌都表现出了与低 GC 含量的革兰氏阳性菌的遗传相似性。最常研究的两个属是芽孢杆菌属，其中的种都是好氧或兼性厌氧的，以及梭状芽孢杆菌属，包括严格厌氧发酵的种。已经发现一种形成内生芽孢的菌，其中阳光细菌（Heliobacteria）是光合营养的（helio 来自希腊文的“太阳”一词）。

表 12.25　形成芽孢的细菌各属[a]

特征	属	DNA/(mol%GC)
杆状		
好氧或兼性，产过氧化氢酶	芽孢杆菌属（*Bacillus*）	32～69
	类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）	40～54
微好氧，无过氧化氢酶；同型发酵的产乳酸菌	产孢乳酸杆菌（*Sporolactobacillus*）	46～47
厌氧菌种：		
还原硫酸盐	脱硫肠杆菌属（*Desulfotomaculum*）	38～50
不还原硫酸盐，发酵	梭菌属（*Clostridium*）（见图 12.56）	21～54
嗜热的，最适温度 65～70℃，发酵	热厌氧菌属（*Thermonanaerobacter*）	31～39
革兰氏阴性；能在 H_2+CO_2 中进行同型乙酸发酵	鼠孢菌属（*Sporomusa*）	41～49
嗜盐，从死海中分离得到	螺旋盐杆菌属（*Sporohalobacter*）	31
每个细胞产生多达 5 个孢子；固氮	厌氧杆菌属（*Anaerobacter*）	29
嗜酸的，最适 pH3	脂环酸芽孢杆菌属（*Alicyclobacillus*）	52～60
嗜碱的，最适 pH9	双芽孢杆菌属（*Amphibacillus*）	36～38
光营养型	阳光杆菌属（*Heliobacterium*），嗜阳菌属（*Heliophilum*），*Heliorestis*	50～58
互养生活，分解脂肪酸，但只与利用 H_2 的细菌共生（见 17.21 节）	共养生孢菌属（*Syntrophospora*）	37
还原性脱去氯酚中的氯（见 17.18 节）	*Desulfitobacterium*	46
球状（通常排列为四分体或方块体），好氧		
	芽孢八叠球菌属（*Sporosarcina*）（图 16.91）	40～41

a. 在发育系统学上，所有菌种皆为革兰氏阳性菌的低 GC 亚类。

在内生芽孢形成菌中发现了大量的遗传异质性。例如，芽孢杆菌属的 GC 含量波动范围接近 40%。尽管如此，在生态学上（ecologically）所有形成芽孢的细菌都有关系，因为在自然界，它们主要见于土壤中。甚至对人类或动物有致病性的那些种主要是腐生性土壤生物，只是偶尔感染寄主。实际上，因为土壤是一个营养水平、温度和水活等变化都很大的环境，孢子的形成对土壤微生物来说是有利的。所以，抗热性和抗干燥性的结构可以使其休眠很长时间（甚至百万年，见 4.13 节），从而保证了芽孢形成菌在自然界的存活率。

芽孢形成菌可以从土壤、食物或者其他材料上有选择的分离出来，即样品加热 80℃处理 10min（巴氏消毒法），使营养细胞被杀死，而留下许多孢子仍然存活。在合适的平板上用处理的样品进行划线接种，并在有氧条件或者无氧条件下培养，将会分别出现芽孢杆菌属和梭菌属。

芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属

表 12.26 概括了芽孢杆菌属的亚属。芽孢杆菌和类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）的一些种在含有任意碳源的限制性培养基上都可以很好地生长。许多芽孢杆菌产生胞外水解酶，分解复杂的多聚物如多糖（图 17.63）、核酸和脂类，从而使微生物能够利用这些产物作为碳源和电子供体。许多芽孢杆菌还产生抗生素，如杆菌肽、多黏细菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽及环杆菌素等。在大多数情况下，抗生素的产生似乎和孢子的形成有关，当培养物进入静止生长期的时候及在它决定形成孢子之后就释放出抗生素。

表 12.26 芽孢杆菌属代表种的特征

特征	属/种	芽孢位置	DNA/(mol%GC)
I. 芽孢卵圆形或柱状，兼性需氧，水解酪素和淀粉；芽孢囊不 膨大，芽孢壁薄			
嗜热性细菌和嗜酸性细菌	凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）	中心或末端	47
	酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）	末端	60
中温性细菌	地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）	中心	46
	蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）	中心	35
	炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）	中心	33
	巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）	中心	37
	枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）	中心	43
昆虫病原菌	苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）	中心	34
芽孢囊显著膨大，芽孢壁厚			
嗜热性细菌	嗜热脂肪杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）	末端	52
中温性细菌	多黏类芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）	末端	44
	软化芽孢杆菌（*Bacillus macerans*）	末端	52
	环状芽孢杆菌（*Bacillus circulans*）	中心或末端	35
昆虫病原菌	幼虫类芽孢杆菌（*Paenibacillus larvae*）	中心或末端	—
	日本甲虫类芽孢杆菌（*Paenibacillus popilliae*）	中心	41
Ⅱ. 芽孢球形，专性需氧，不水解酪素和淀粉			
芽孢囊膨大	球形芽孢杆菌（*Bacillus sphaericus*）	末端	37
芽孢囊不膨大	巴氏芽孢八叠球菌（*Sporosarcina pasteurii*）	末端	38

几种芽孢杆菌，最有名的是日本甲虫类芽孢杆菌（*P. popilliae*）和苏云金芽孢杆菌（*B. thuringiensis*），它们可以产生杀死昆虫幼虫的物质。日本甲虫类芽孢杆菌能引起日本甲虫幼虫和与之关系密切的金龟子科甲虫幼虫的致死性疾病，乳状病（milky disease）。苏云金芽孢杆菌能引起许多种属昆虫幼虫的致死性疾病，尽管单个品系对宿主有特异性。有些菌株对鳞翅目昆虫有特异性，如家蚕、卷心菜虫、黄褐天幕毛虫、舞毒蛾。有些品系可以杀死双翅目昆虫，如蚊子和蚋。还有一些品系能杀死鞘翅目昆虫，如科罗拉多马铃薯甲虫。对日本甲虫有毒性的苏云金芽孢杆菌株系也已被发现。从苏云金芽孢杆菌和日本甲虫类芽孢杆菌得到的孢子具有生物杀虫剂的商业潜力。

由日本甲虫芽孢杆菌引起的疾病是一种败血症，而苏云金芽孢杆菌引起的疾病是一种中毒。两种昆虫病原菌都可在芽孢形成期间合成晶体蛋白，被称为伴胞晶体（parasporal body），它沉积在芽孢囊内但在芽孢之外（图 12.57）。在苏云金芽孢杆菌中，晶体（伴胞晶体）蛋白是一种原毒素蛋白，能在幼虫中的肠蛋白酶水解作用下转变为毒素。毒素与中肠表皮细胞结合，并且诱导孔洞形成，使得宿主细胞渗漏以至裂解。

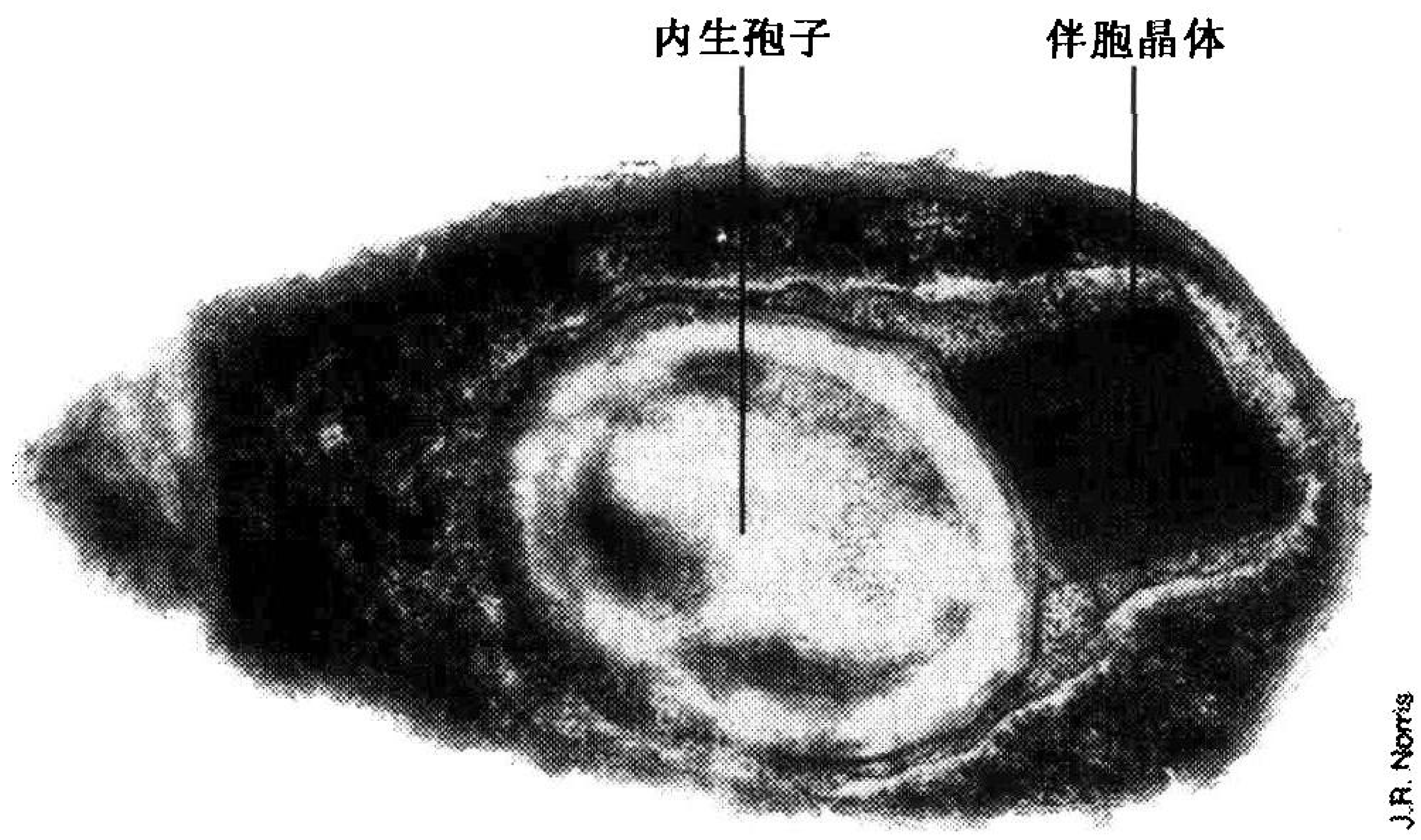


图 12.57 在昆虫病原菌苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）中形成的毒性伴胞晶体。超薄切片电子显微照片。晶体蛋白（Bt 毒素）是一种可以引起特定昆虫的肠细胞裂解的毒性蛋白质。

已经从几个苏云金芽孢杆菌品系中分离得到编码晶体蛋白（商业上称“Bt 毒素”）的基因，并且将该基因导入植物体，使植物对昆虫具有天然的抗性。通过基因工程技术可以开发新的毒性更强的晶体蛋白，同时降低昆虫对它的抗性（见 31.10 节）。

梭菌属

梭状芽孢杆菌不像芽孢杆菌属，它们缺少细胞色素系统和氧化磷酸化作用的机制，因此它们只有靠底物水平磷酸化作用获得 ATP。在梭状芽孢杆菌中已知有多种厌氧产能机制（发酵的多样性将在 17.20 节中讨论）；事实上，该属分成亚群主要是以这些性质和使用的发酵底物的特征作为依据（表 12.27）。

表 12.27　梭菌属的一些类群的特征

主要特征	其他特征	种名	DNA/(mol%GC)
Ⅰ．发酵碳水化合物			
发酵纤维素	发酵产物：乙酸、乳酸、琥珀酸、乙醇、CO_2、H_2	产纤维二糖梭菌（*C. cellobioparum*）[a]	28
		嗜热纤维梭菌（*C. thermocellum*）	38～39
发酵糖类、淀粉、果胶	发酵产物：丙酮、丁醇、乙醇、异丙醇、丁酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、CO_2、H_2；有些有固氮作用	丁酸梭菌（*C. butyricum*）	27～28
		丙酮丁酸梭菌（*C. acetobutyricum*）	28～29
		巴氏梭菌（*C. pasteurianum*）	26～28
		产气荚膜梭菌（*C. perfringens*）	24～27
发酵糖类，主要发酵为乙酸	从 CO_2完全合成乙酸；某些种有细胞色素	醋酸梭菌（*C. aceticum*）	33
		热醋穆尔氏菌（*Moorella thermoacetica*）	54
		蚁酸醋酸梭菌（*C. formincaceticum*）	34
只发酵戊糖或甲基戊糖	指环形细胞形成左手螺旋的长链；发酵产物：乙酸丙酸、*n*-丙醇、CO_2、H_2	甲基戊糖梭菌（*C. methylpentosum*）	46
Ⅱ．发酵氨基酸	发酵产物：乙酸、其他脂肪酸、NH_3、CO_2，有时为 H_2；有些也发酵糖类产生丁酸或乙酸；可能产生外毒素（见 21.10 节，27.8 节和 29.5 节）	生孢梭菌（*C. sporogenes*）	26
		破伤风梭菌（*C. tetani*）	25～26
		肉毒梭菌（*C. botulinum*）	26～28
		假破伤风梭菌（*C. tetanomorphum*）	25～28
	发酵三碳化合物（如丙氨酸）为丙酸、乙酸和 CO_2	丙酸梭菌（*C. propionicum*）	35
Ⅲ．发酵碳水化合物或氨基酸	从葡萄糖发酵的产物：乙酸、甲酸、少量异丁酸、和异戊酸	双酶梭菌（*C. bifermentans*）	27
Ⅳ．发酵嘌呤	发酵尿酸和其他嘌呤，产生乙酸、CO_2和 NH_3	尿酸梭菌（*C. acidurici*）	27～30
Ⅴ．乙醇发酵脂肪酸	产生丁酸、己酸酯和 H_2；需乙酸作电子受体；不需要糖、氨基酸或嘌呤	科氏梭菌（*C. kluyveri*）	30

a. 菌种开头的“*C.*”代表 *Clostridium*。

许多梭菌发酵糖类，产生丁酸（butyric acid）作为其主要的终产物。其中一些细菌也产生丙酮（acetone）和丁醇（butanol），梭菌丙酮-丁酸发酵法具有重大的工业意义，是这些产物的主要工业来源。丙酮-丁酸类型的一些梭菌能固定 N_2；而最强有力的固氮菌是巴氏梭菌（*C. pasteurianum*），它可能担负着土壤主要的厌氧固氮作用。有一类梭菌发酵纤维素，并产生酸类和醇类，而且这些细菌是土壤中厌氧分解纤维素的主要微生物。

从糖类产生丁酸和丁醇的生物化学步骤已经被人们完全了解（图 12.58），葡萄糖经过 EMP 途径被转变为丙酮酸盐，丙酮酸盐通过磷酸裂解反应被分解为乙酰辅酶 A（CoA）、CO_2和 H_2（通过还原铁氧还蛋白）（见 17.19 节和图 17.51）。乙酰 CoA 然后利用糖酵解反应得到的 NADH 被还原为发酵产物。不同产物的比例受发酵时间的长短和发酵条件影响。

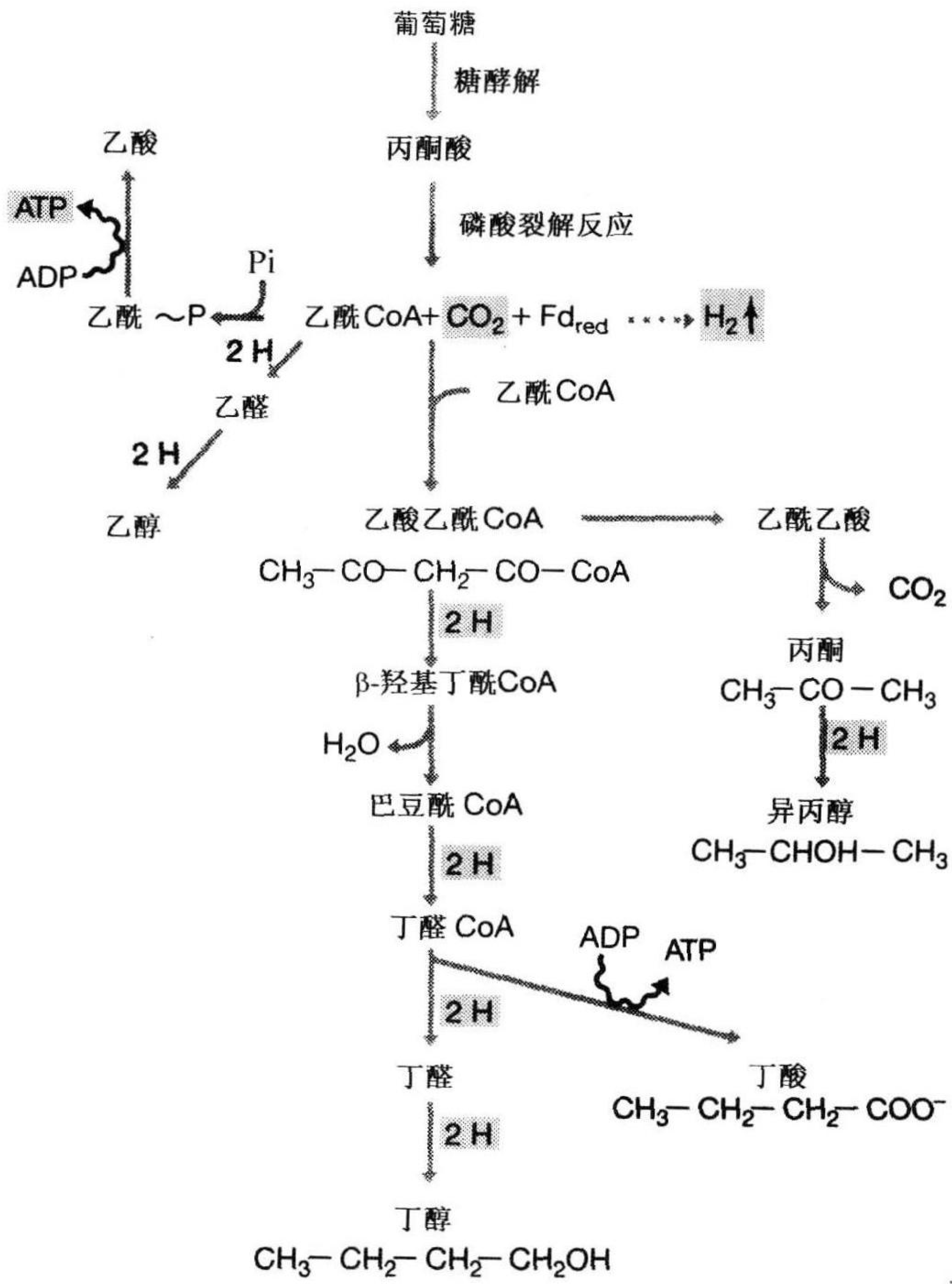
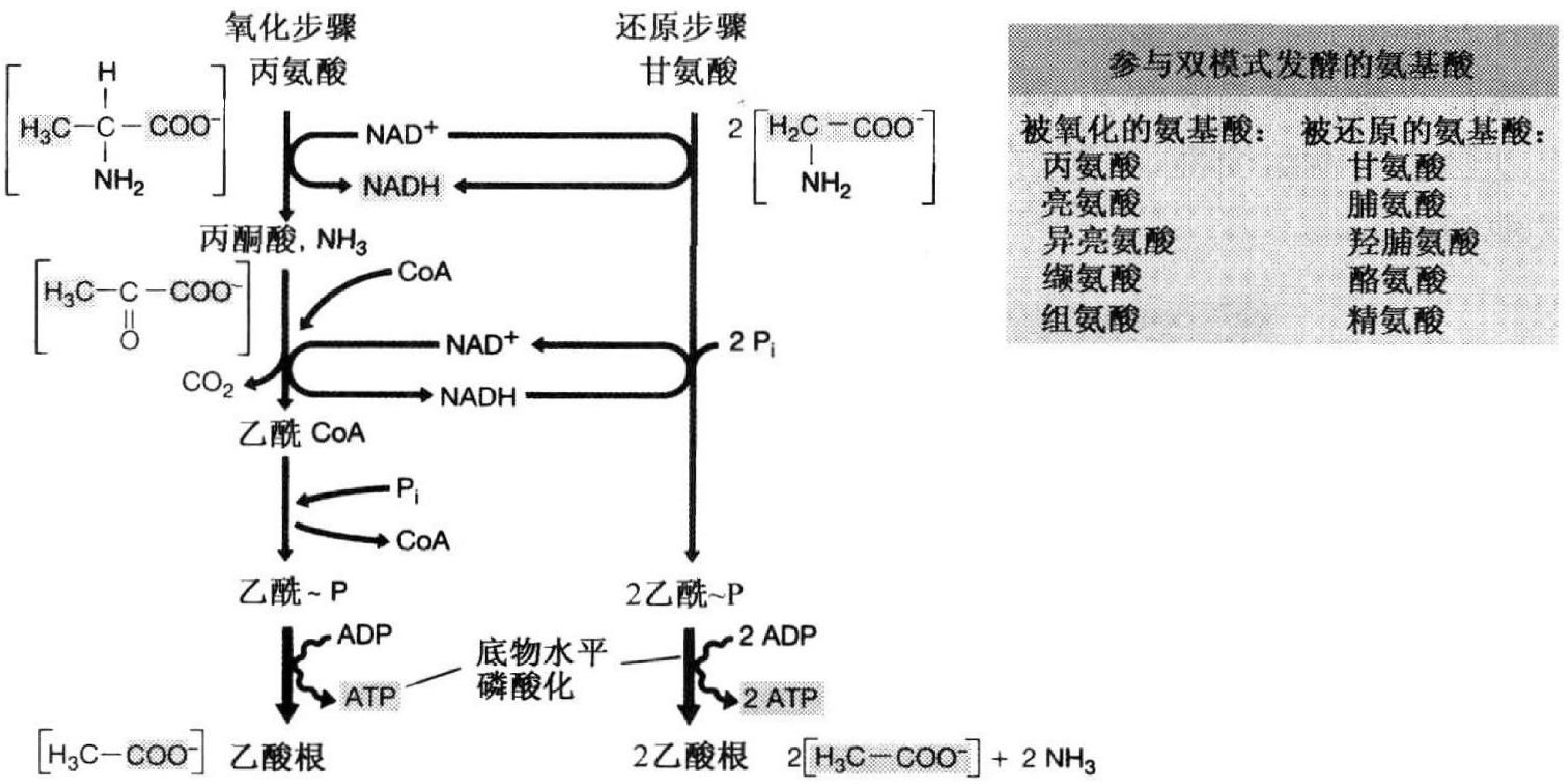


图 12.58　梭菌（*Clostridium*）的丁酸菌群发酵产物的形成途径。标记为“2H”的代表 1 分子 NADH 的 2 个电子。注意通过底物水平磷酸化形成醋酸盐和丁酸盐如何产生额外的 ATP（见 17.19 节）。相反，丁醇和丙酮的形成（这两种产物的量一般是 1∶1，因为 1mol 丁醇的形成需要 2mol 的 NADH，而丙酮的合成则不需要）降低了 ATP 的产量是因为绕过了丁酰 CoA 生成丁酸这一步。

在丁酸发酵早期阶段，丁酸和乙酸是主要产物，但当培养基的 pH 下降时，酸类合成停止，中性产物丙酮和丁醇开始积累。然而，如果用 $CaCO_3$ 使培养基保持碱性，则中性产物很少产生，而发酵产物的组成大约是 3 份丁酸和 1 份乙酸。这具有很重要的生理学意义，因为不像中性产物的形成，酸性产物的形成需要额外的 ATP 合成（图

12.58)。

另一类梭菌通过发酵氨基酸（amino acid）获得能量。有些菌株不发酵单一的氨基酸，而只发酵成对的氨基酸。在这种情况下，一种氨基酸可作为电子供体（electron donor）被氧化，另一种作为电子受体（electron acceptor）被还原。这种偶联分解的类型就称为斯蒂克兰德氏反应（Stickland reaction）。例如，生孢梭菌（*C. sporogenes*）会利用甘氨酸和丙氨酸的混合物（图 12.59）。图 12.59 中列出了斯蒂克兰德氏反应的各种氨基酸，它们或者做电子供体，或者做电子受体。氧化作用的产物总是 NH_3、CO_2及比氧化氨基酸少带一个碳原子的羟酸（图 12.59）。



总反应：丙氨酸+2甘氨酸+$2H_2O$+3ADP+$3P_i$ ⟶ 3乙酸根+CO_2+$3NH_4^+$+3ATP

图 12.59　生孢梭菌（*Clostridium sporogenes*）在丙氨酸和甘氨酸之间的偶联氧化还原反应。 图中给出了关键的底物、中间物和产物的结构（括弧中），以示化学反应的可行性。如图中反应所示，丙氨酸是电子供体，而甘氨酸是电子受体。

某些氨基酸可以单独发酵，包括丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、丝氨酸和苏氨酸。产物通常是乙酸、丁酸、CO_2和 H_2。梭菌的氨基酸发酵产物有很多是有臭味的物质，腐败作用产生的气味主要是梭菌作用的结果。除丁酸外，产生的其他有气味的化合物是异丁酸、异戊酸、已酸、硫化氢、甲硫醇（来自含硫氨基酸）、尸胺（来自赖氨酸）、腐胺（来自鸟氨酸）和氨。

梭菌的主要生境是土壤，它们主要存在于其中的厌氧"袋"中，这大概是因为兼性微生物作用于其中的各种有机化合物造成的厌氧生活环境。许多梭菌已经适应了哺乳动物肠道中的厌氧环境。此外，正如 21.8 节讨论的，几种梭菌在特定的条件下，能够引起人类的疾病。肉毒中毒症是由肉毒梭菌（*C. botulinum*）引起的，破伤风是由破伤风梭菌（*C. tetani*）引起的，气性坏疽是由产荚膜梭菌（*C. perfringens*）和许多其他的梭菌引起的，它们都是糖类和氨基酸发酵菌。这些致病性的梭菌在代谢上似乎并无特殊的地方，它们在产生特殊的毒素上或者在引起气性坏疽的那一类毒素上是独特的（见 21.10 节和表 21.4），许多气性坏疽及其相关菌也引起人和动物的相关疾病（见 29.6 节），在绵羊和鸭中也有肉毒中毒症发生。有一个尚未解决的生态学问题是，在微生物

的自然环境中这些毒素起着什么作用。

芽孢八叠球菌属

芽孢八叠球菌属是芽孢形成菌中较为独特的，因为它的细胞是球形而不是杆状。芽孢八叠球菌是由严格好氧的球形到卵形的细胞组成，这些细胞在 2 个或者 3 个垂直平面上分裂成 3 个细胞或者更多个细胞的四分体或“方块体”（图 12.60）。芽孢八叠球菌属的主要种是尿素八叠球菌（*Sporosarcina ureae*）。这种细菌（图 12.60）很容易从土壤中富集，可以将高温处理过的土壤样品的悬液铺于含有 8%尿素的碱性营养琼脂上，通气培养即可得到。绝大多数的土壤细菌被低至 2%的尿素强烈抑制。不过。尿素八叠球菌却能有效地将尿素降解为 CO_2 和 NH_3，这样使培养基的 pH 显著升高，尿素八叠球菌有着明显的碱耐受性，可以在 pH10 的培养基中生长。这个特征可以用于从土壤中富集这种细菌。

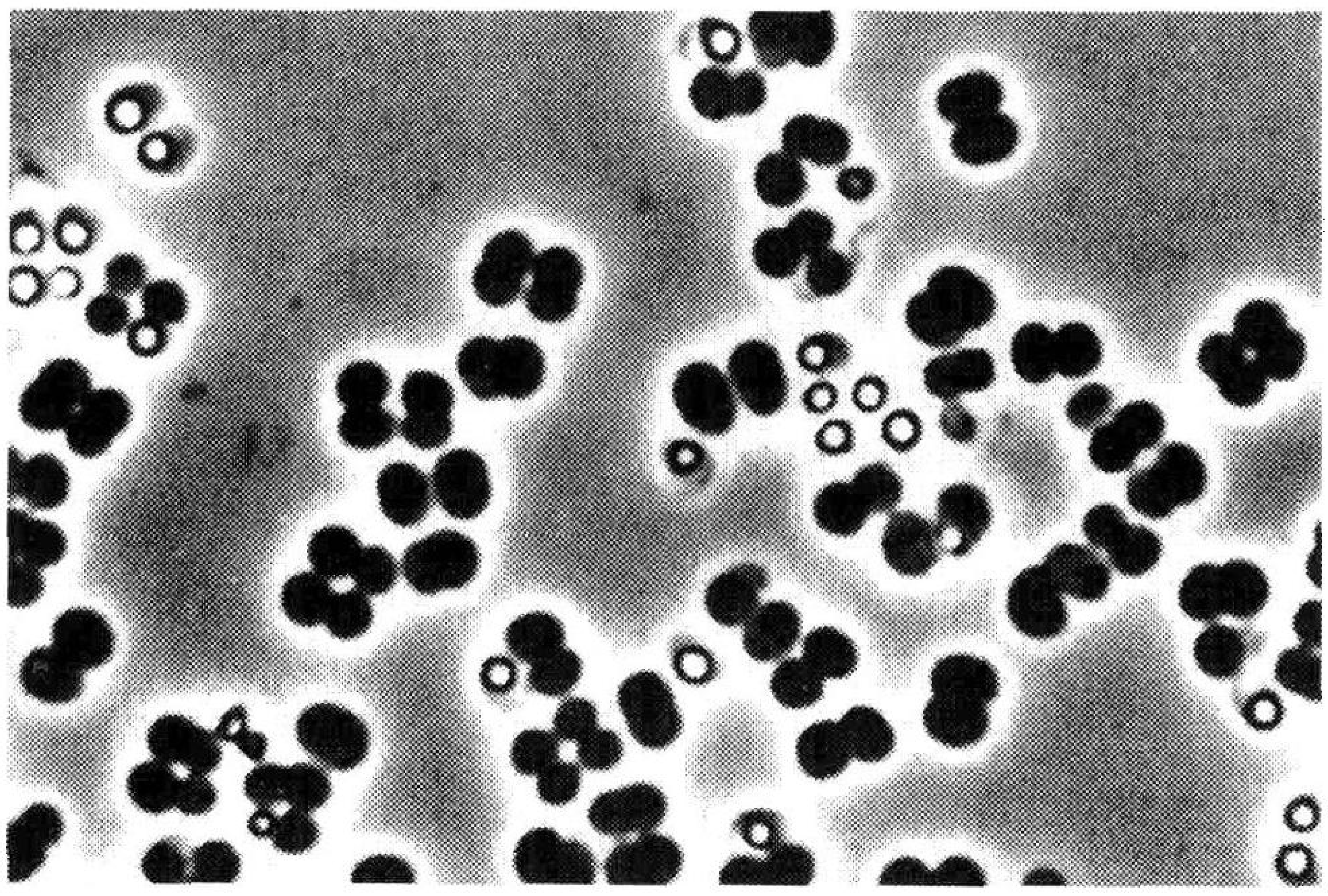


图 12.60 尿素八叠球菌细胞的相差显微照片，单个细胞约 2μm 宽。注意明亮的有折光性的内生芽孢。绝大多数细胞叠堆含有 8 个细胞。

尿素八叠球菌是土壤中的常见菌，对它的分布进行研究表明，在那些吸收脲（尿素的一个来源）的土壤中，此菌的数量是最多的，如在动物长期排尿处的土壤中。由于许多土壤微生物对尿素是非常敏感的，这个结果揭示了尿素八叠球菌作为自然界中尿素降解者在生态学上是非常重要的。

阳光细菌

阳光细菌是低 GC 含量、革兰氏阳性的光能利用细菌。阳光细菌是不产氧的光养细菌，它具有一种可以产生菌绿素的独特结构菌绿素 g（bacteriochlorophyll g）（见 17.2 节）。这一类细菌包括阳光杆菌属（*Heliobacterium*）、嗜阳菌属（*Heliophilum*）、阳光小杆菌属（*Heliobacillus*）和 *Heliorestis*。所有已知的阳光细菌都是杆状的，长杆状或短杆状，通常末端尖锐（图 12.61）。嗜阳菌属的形态学很有趣，因为它的杆状细胞形成束（图 12.61b），以束为运动单元。

阳光细菌是严格厌氧的，但是除了厌氧、利用光生长，它们也可以在黑暗中通过丙酮酸盐发酵（像许多与阳光细菌关系很近的梭菌一样，）进行化能生长。像形成内生芽孢的芽孢杆菌属或梭菌属的种类，阳光细菌的内生芽孢（图 12.61c）含有很高水平的 Ca^{2+}、信号分子和吡啶二羧酸（dipicolinic acid）（见 4.13 节）。阳光细菌主要存在于土壤中，特别是稻田土壤中，它们的固氮活性对水稻的生产会很有利。在高碱的环境中，有许多阳光细菌也被分离出来，如苏打湖及其周围的碱性土壤中。

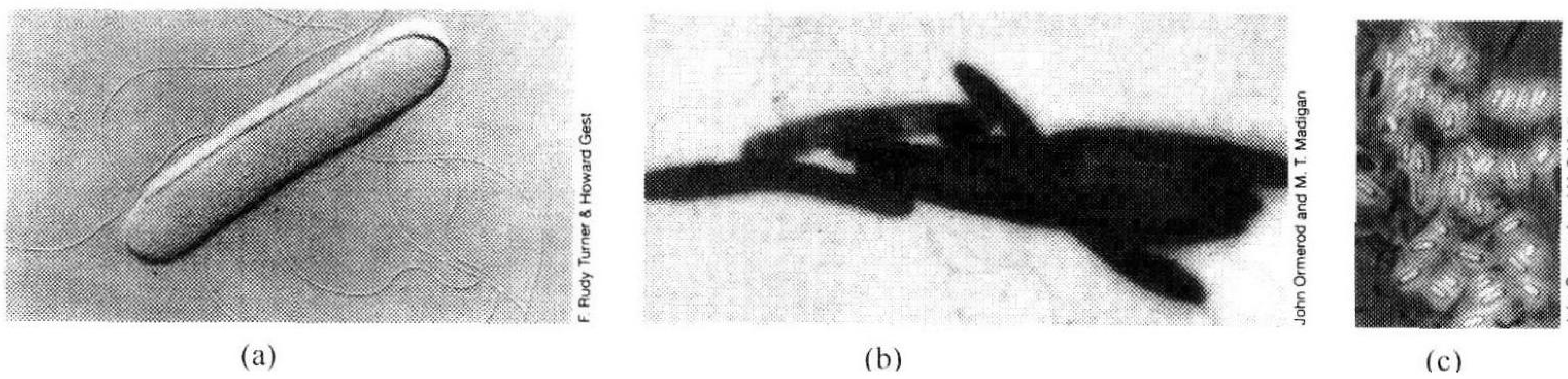


图 12.61　阳光细菌（*Heliobacteria*）的细胞和内生芽孢。（a）运动阳光小杆菌（*Heliobacillus mobilis*）的电子显微照片，是周生鞭毛的细胞。（b）电镜观察的嗜阳菌属（*Heliophilum*）细胞，形成束状。（c）盖氏阳光杆菌（*Heliobacterium gestii*）内生芽孢的相差显微镜照片。

概念检查

低 GC 含量、革兰氏阳性的细菌是一个很大的系统发育群体，包括杆菌和球菌，形成芽孢和不形成芽孢的类群。形成芽孢是芽孢杆菌属和梭菌属的最主要特征。革兰氏阳性菌是降解土壤中有机物的主要细菌，而一些种类是病原性的。

- 葡萄球菌属和芽孢杆菌属的不同处主要存在哪些方面？
- 如何区分同型发酵和异型发酵的乳酸细菌？
- 芽孢杆菌属和梭菌属的主要生理差异是什么？
- 在形成内生芽孢的属中，阳光细菌有什么独特的性质？

12.21 无细胞壁、低 GC 含量、革兰氏阳性菌：支原体

代表属：支原体属（*Mycoplasmas*）、螺原体属（*Spiroplasma*）

支原体是没有细胞壁的微生物，它们不能恢复细胞壁，可能是最小的能够自主生长的微生物，由于它们简单的细胞结构和非常小的基因组，使它们有着特殊的进化意义。另外，由于缺少细胞壁，无法进行革兰氏染色，它们在系统发育学上与低 GC 含量、革兰氏阳性的细菌相关。它们是一类曾经有细胞壁，但是在进化的过程中细胞壁逐渐消失的细菌。支原体是寄生菌，通常寄生在各种各样的动物和植物体上。

支原体的特征

曾经用电子显微镜观察和化学分析证明支原体没有细胞壁，化学分析表明，缺乏主要的细胞壁成分——肽聚糖（peptidoglycan）、胞壁酸（muramic acid）和二氨基庚二

酸（diaminopimelic acid）（见 4.8 节）。在第 4 章中我们讨论了原生质体，并且指出了原生质体是怎样形成的，即当细胞壁消化酶作用于被渗透性稳定剂保护的细胞，除去渗透性稳定剂以后，原生质体吸水、膨胀并破裂（图 4.33）。支原体和原生质体相似，它们都缺少细胞壁，但是前者对渗透性溶胞作用有较强的抵抗力，并且在原生质体溶解的条件下还能够存活。这种抗渗透性溶胞作用的能力至少部分地取决于甾醇（sterol）的存在（见 4.5 节），使该细胞膜比其他原核生物的更稳定。事实上，一些支原体需要在其培养基上加入甾醇，对甾醇的这一需求是目前把支原体分成两个类群的依据（表 12.28）。

表 12.28 支原体的主要特征[a]

属	性质	DNA/(mol%GC)	基因组大小/kb	脂多糖的存在
需要甾醇				
支原体（*Mycoplasma*）	许多为病原性的；需甾醇；兼性需氧（图 12.62）	23～41	600～1350	+
厌氧支原体属（*Anaeroplasma*）	需或不需甾醇；专性厌氧；降解淀粉，产生乙酸、乳酸和甲酸＋乙醇＋CO_2；被乙酸铊抑制；发现于牛和绵羊的瘤胃内	29～33	1500～1600	+
螺原体属（*Spiroplasma*）	螺旋形成螺丝刀形状的细胞；与各种植物病原菌条件有关	25～30	940～2200	−
尿支原体属（*Ureaplasma*）	球形细胞；偶尔集结成簇或短链；在 pH6 最适生长；强脲酶反应，与人类尿道感染相关；被乙酸铊抑制	27～30	750	−
虫原体属（*Entomoplasma*）	兼性需氧；与昆虫和植物有关	27～29	790～1140	?
不需甾醇				
无胆甾原体属（*Acholeplasma*）	兼性需氧	27～36	1500	+
无甾醇支原体属（*Asteroleplasma*）	专性厌氧，从牛或绵羊瘤胃中分离	40	1500	+
中间原体属（*Mesoplasma*）	在系统生物学和生态学上与虫原体属相关	27～30	870～1100	?

a. 系统发育学上，所有的支原体都是革兰氏阳性菌中的低 GC 亚类的成员。

除了甾醇，某些支原体还含有叫做脂多糖（lipoglycan）的化合物（表 12.28）。脂多糖是长链的杂多糖共价结合于膜上的脂类，并且包埋于许多支原体的细胞质膜中。脂多糖与革兰氏阴性菌的脂多糖（lipopolysacchar，LPS）（见 4.9 节）相似，但它们缺少典型的细菌 LPS 的脂质骨架和磷酸酯。脂多糖也可帮助稳定细胞膜，它还被认为能辅助支原体吸附于动物细胞表面的受体。与 LPS 一样，脂多糖注入实验动物体内可刺激抗体产生。

支原体的生长

支原体细胞一般相当小，它们的形态极其多变，这是由于无细胞壁而缺乏硬度的结果。单独一个培养物可以显现出小球形细胞，较大的膨胀形体及长短不一、常高度分支的丝状形体（图 12.62）。

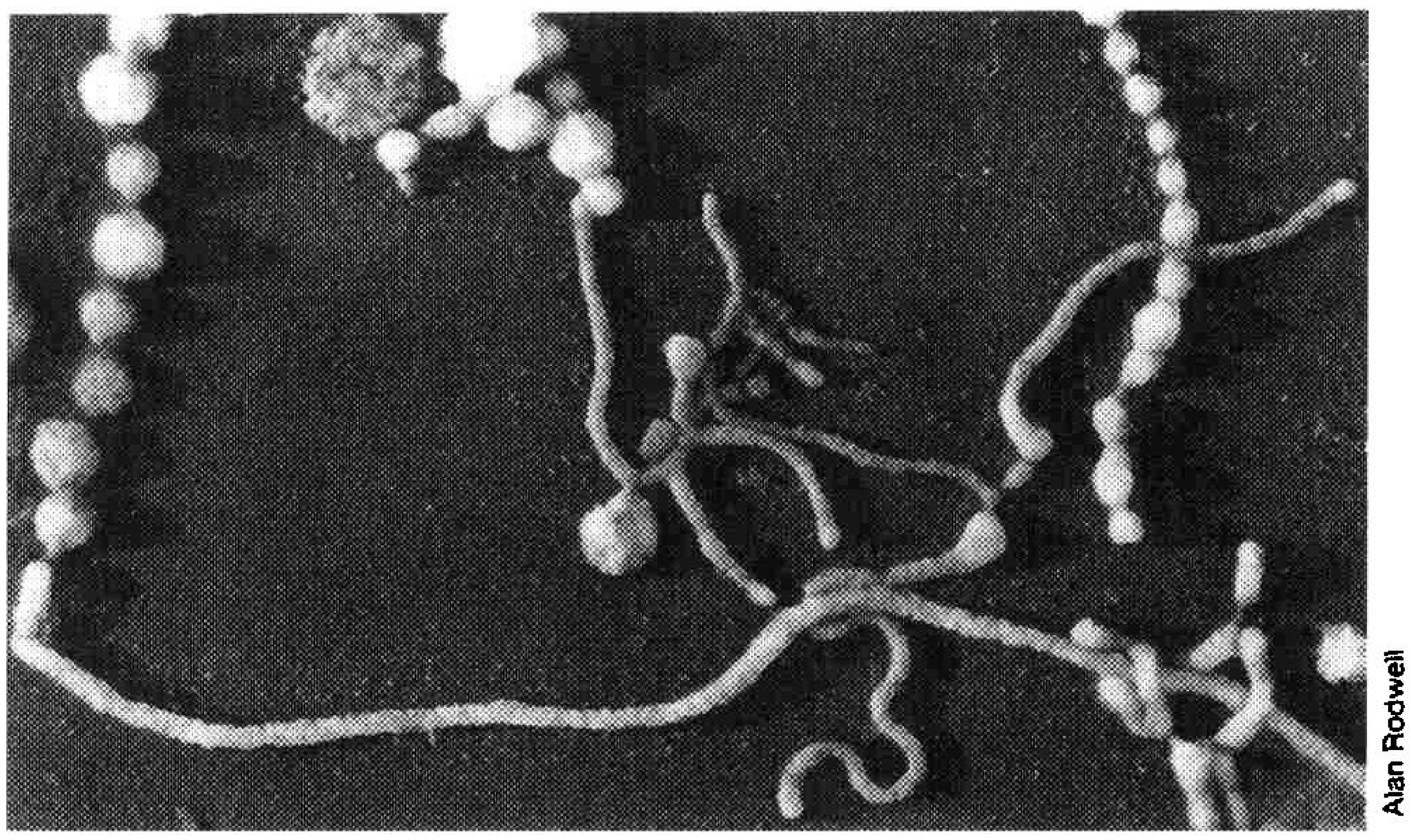


图 12.62　蕈状支原体（*Mycoplasma mycoides*）的金属投影制备物电镜照片。注意有球形和菌丝样成分。菌体链中的细胞直径平均为 0.5μm。

小球形体（大小 0.2～0.3μm）是能独立生长的最小的支原体单位。在支原体培养物中，有接近于 0.1μm 的细胞形体，但这些细胞是不能生长的。即使如此，0.2～0.3μm 的最小繁殖单位或许就是最小的自由生活（free living）细胞（见 4.4 节）。另外，支原体基因组和大多数原核生物相比也是较小的，DNA 为 500～1100kb（表 12.28），相当于专性寄生的衣原体属和立克次氏体（见 12.27 节和 12.23 节），大约为 *E. coli* 的 1/5～1/4。生殖道支原体（*M. genitalium*）基因组有 580kb，完整的序列已经被测出（见 15.3 节）。这么小的基因组被认为是任何细菌生命活动正常进行所必须携带的最少量的 DNA（第 13 章中，我们将在古生菌、纳米古生菌中看到更小的基因组）。

支原体在液体和琼脂培养基中的生长方式是不同的。在琼脂上有埋入培养基生长的趋势。支原体在琼脂上的菌落呈现出一种特有的“煎蛋”形状，因为形成致密的核心向下穿入琼脂，而四周有一淡色的圆形扩展区（图 12.63）。支原体的生长不受青霉素、环丝氨酸或其他抗生素的抑制，但是和其他的细菌一样，对作用于除细胞壁之外的靶位点上的抗生素有敏感性。

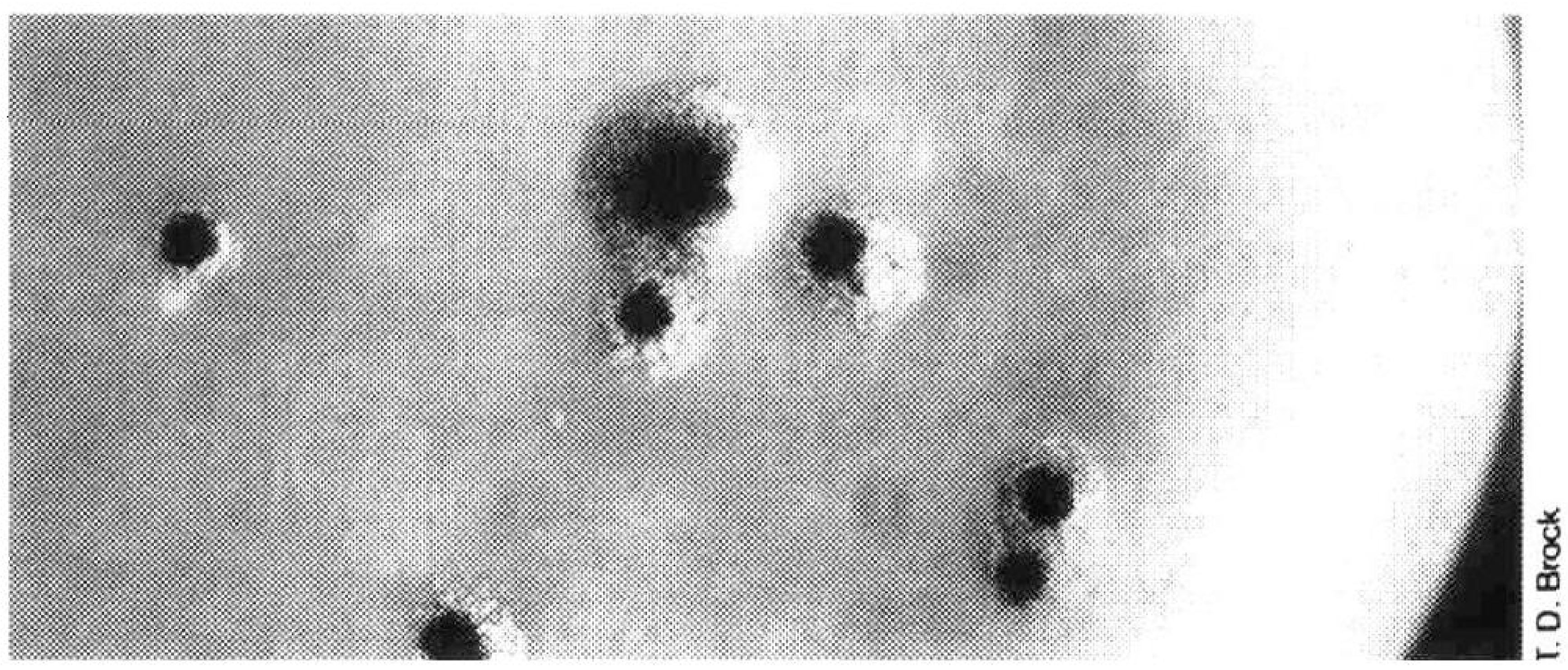


图 12.63　琼脂上支原体菌落呈典型的“煎蛋”形状。菌落直径约 0.5mm。

支原体生长的培养基是很复杂的。对于许多种，即使在复杂的酵母膏蛋白胨牛心浸汁培养基中也生长不良或根本不生长。除非加入新鲜血清或腹水这两种辅助剂所提供的主要成分——不饱和脂肪酸和甾醇。但是有些支原体可以在比较简单的培养基上培养，并且某些支原体也可用合成培养基进行培养。多数支原体利用碳水化合物作为碳源和能

源，并需要一系列的维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶作为生长因子。支原体的能量代谢不是独特的，有些种是好氧的，而有的则是兼性厌氧甚至严格厌氧的（表 12.28）。

螺原体属

螺原体属由呈球形或微卵圆形、无细胞壁的细胞组成（图 12.64）。尽管螺原体缺乏细胞壁和鞭毛，但它们能以旋转或缓慢的波浪形方式运动。已证实细胞内的原纤维对这种运动起作用。从蝉、昆虫的血淋巴和中肠（图 12.64）、植物的维管液及以流体为食的昆虫、还有花和其他植物部分的表面上都曾分离到螺原体。

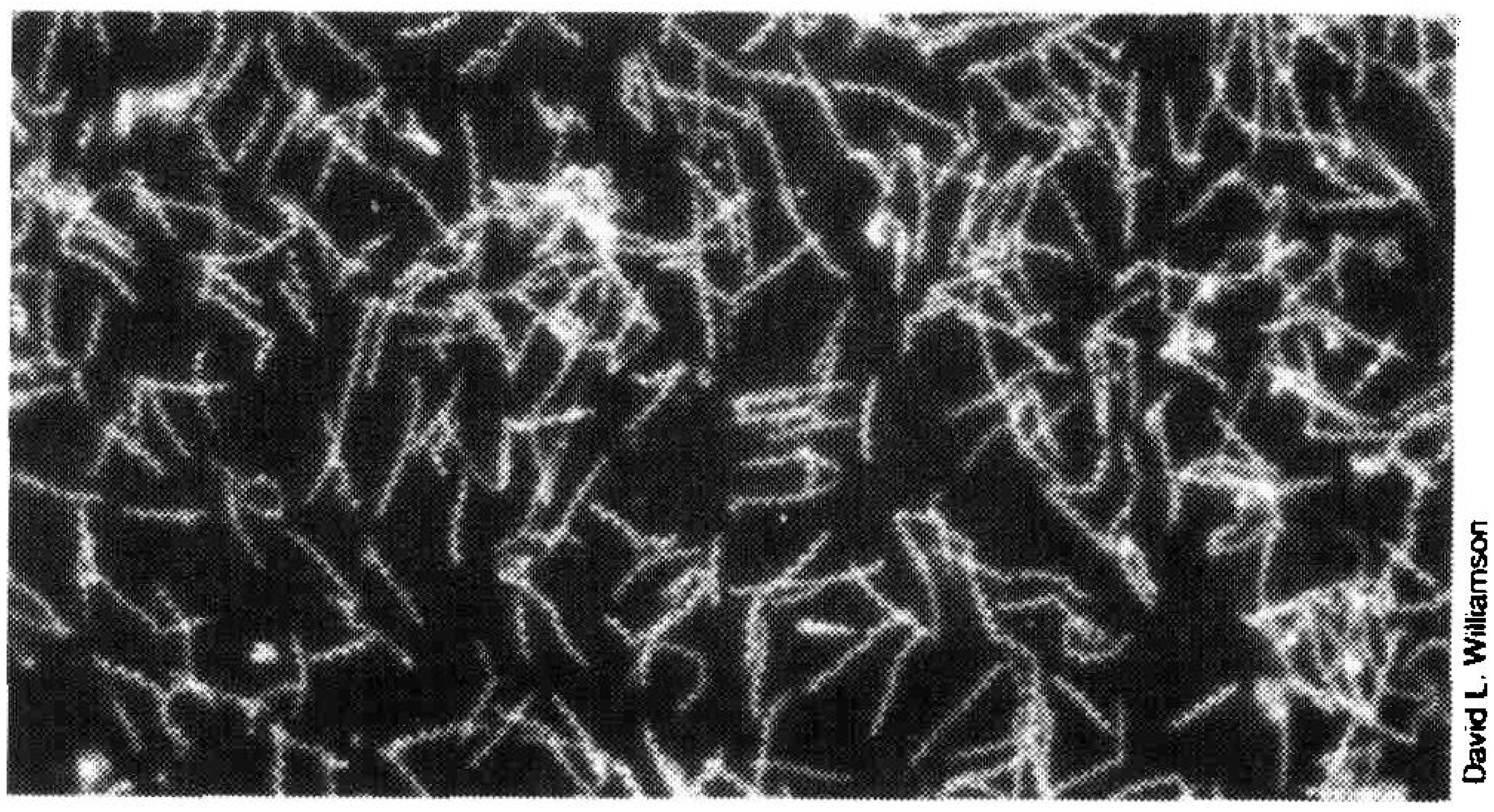


图 12.64 类趋暗果蝇（*Drosophila pseudoobscura*）的血淋巴中性比率螺原体的暗视野显微照片。雌性果蝇被性比率螺原体感染后只繁殖出雌性后代。单个螺原体细胞直径约为 0.15μm。暗视野使得这些极细的细胞可见（见 4.1 节）。

从柠檬的叶子上分离到的柠檬螺原体（*Spiroplasma citri*）能引起顽固病，从患矮化病的玉米中也能分离到，该螺原体能引起玉米顽固病。通过电镜还观察到病株体内有其他一些类似支原体的小体，表明可能存在着与植物相关的大的支原体类群。另外，已鉴别出 4 种螺原体，能够引起多种动物疾病，如蜜蜂螺原体病（honeybee spiroplasmosis）和甲虫蛴螬的嗜睡症（lethargy disease）等。

概念检查

支原体类群缺乏细胞壁，而且只有很小的基因组。许多种需要甾醇来使其细胞膜坚固，有些对人、动物及植物有致病性。

- 与其他原核细胞相比，为什么支原体需要更强的细胞膜？
- 支原体在系统发育中的划分？
- 为什么游动的螺原体不长鞭毛？

12.22 高 GC 含量、革兰氏阳性菌(放线菌)：棒杆菌和丙酸细菌

代表属：棒杆菌属（*Corynebacterium*）、节杆菌属（*Arthrobacter*）、丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）

高 GC 含量，革兰氏阳性的细菌形成了放线菌门。这个类群非常大，包含了 30 个以上分类学上的家族（见 11.10 节）。放线菌类细菌都是典型的从杆状到线状，好氧，在土壤里生长或寄生在植物体。通常它们是无害共生的，分枝杆菌属［如结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）］是例外。许多菌无论是在抗生素生产方面还是在发酵乳制品上都有重要的经济价值。我们将从有代表性的杆菌开始。

棒状细菌

棒状细菌是革兰氏阳性、好氧、不运动、杆状的细菌，在正常的生长过程中，它们有形成不规则形状、棒状或 V 形细胞排列的特征。V 形细胞群的产生是由于刚好在细胞分裂之后发生折断运动（称为裂殖后运动或折断分裂）的结果（图 12.65）。折断分裂已经被证实出现在一个种中，因为该种细菌的细胞壁由两层组成，只有内层参与横壁形成。因此，在横壁形成之后，两个子细胞仍然由胞壁的外层连接。在外层的一侧的局部发生破裂，使两个细胞在远离破裂处产生弯曲（图 12.66），这样就出现了 V 形的形状。

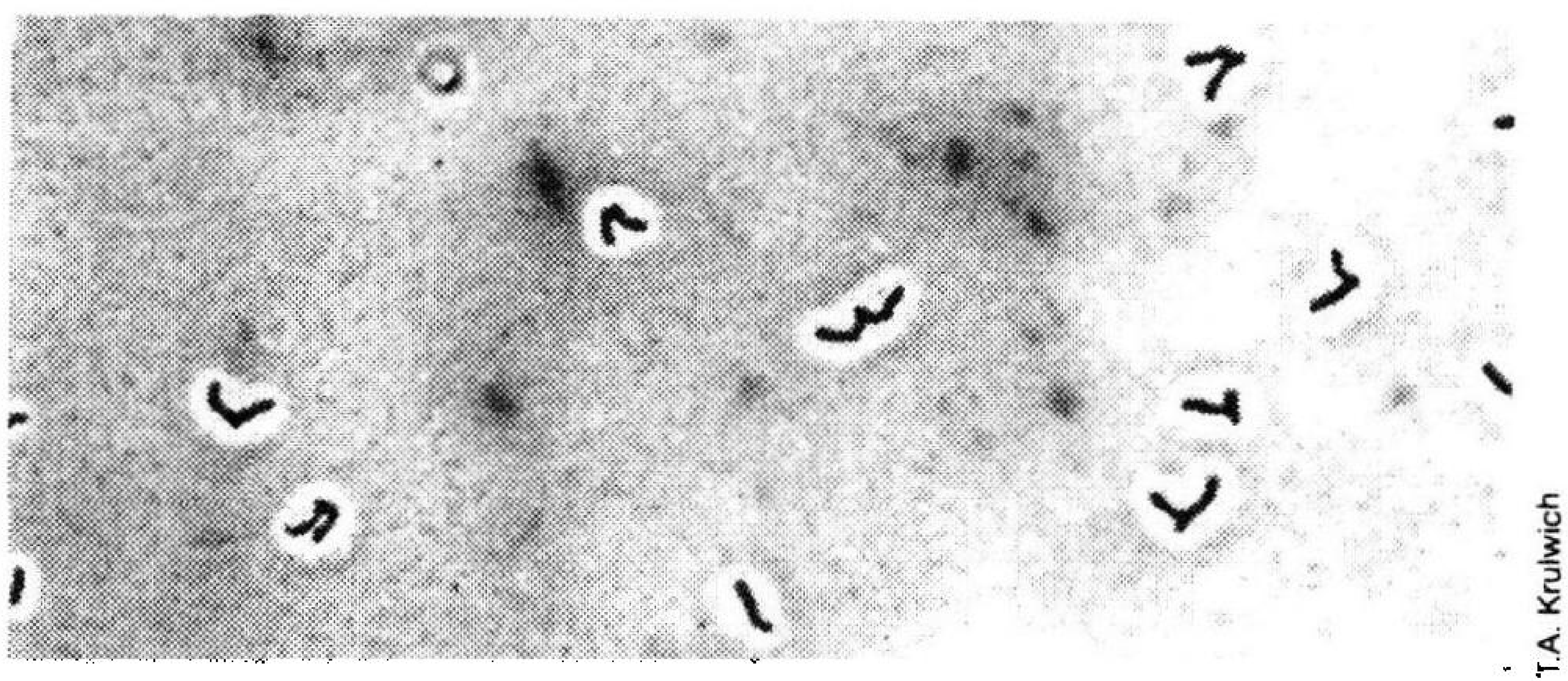
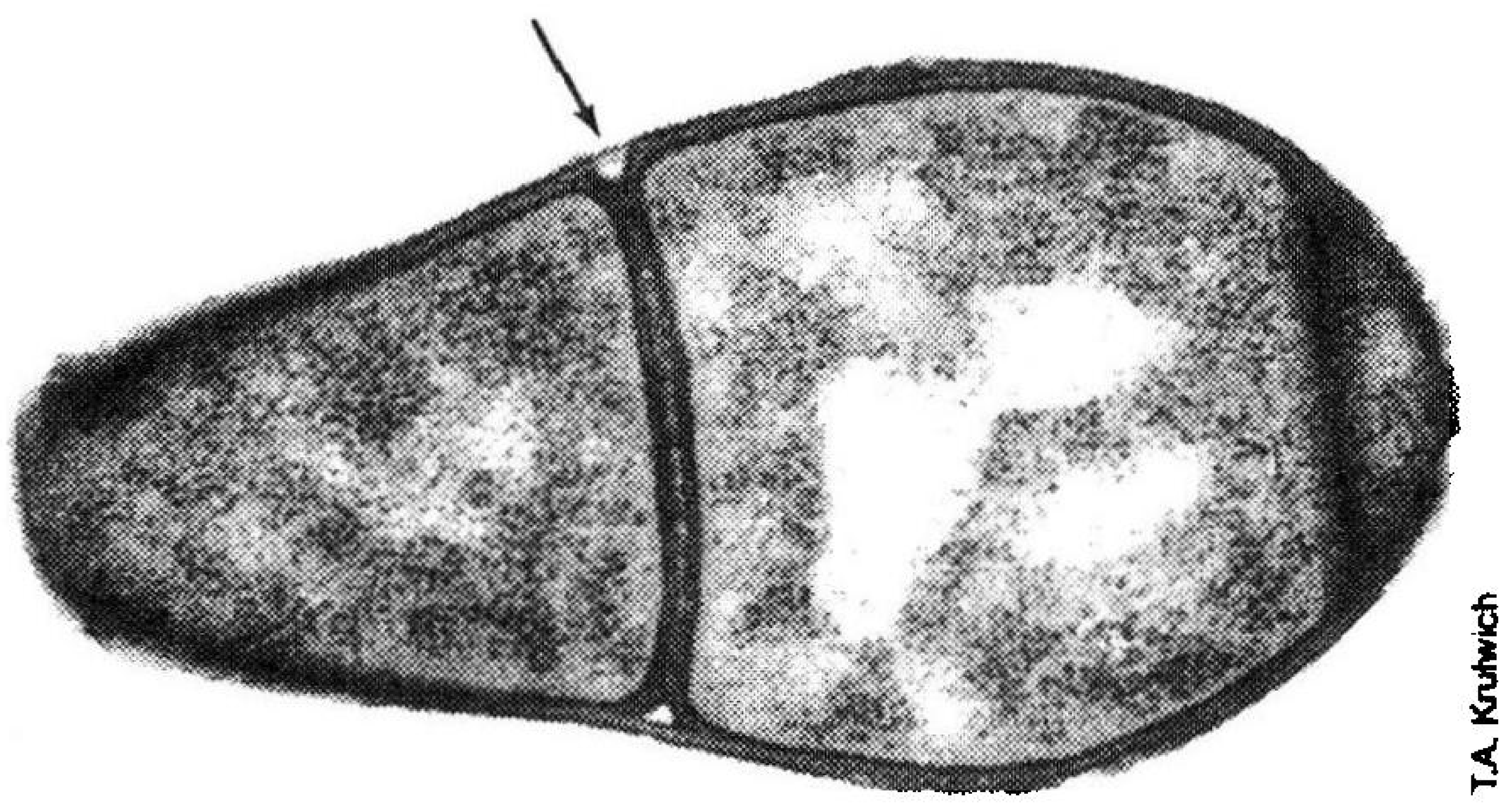


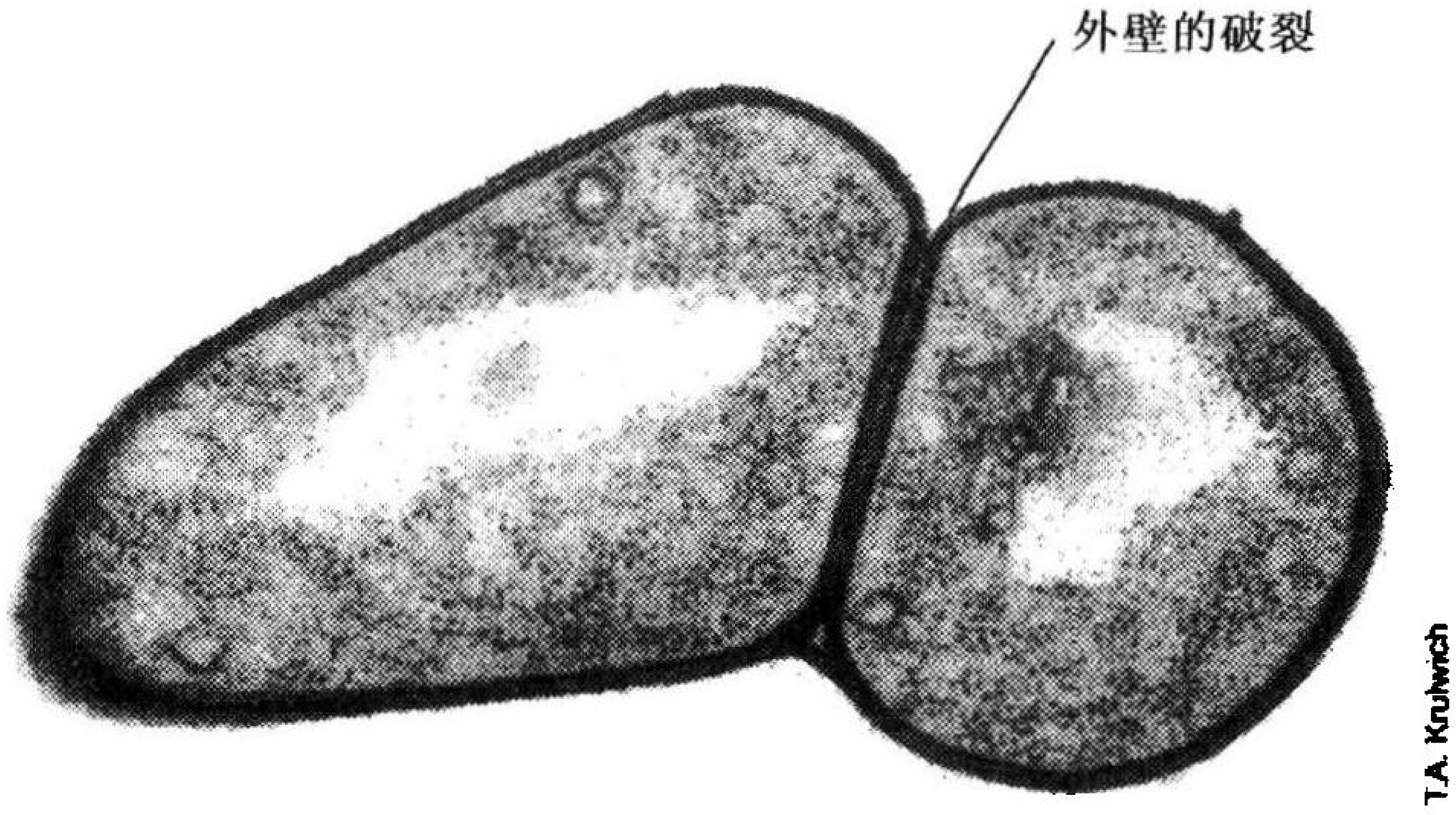
图 12.65　节杆菌（*Arthrobacter*）的折断分裂。节杆菌的特征性的 V 形细胞群显微照片，此种细胞由折断分裂造成，细胞直径约为 0.9μm。

棒状细菌的代表属是棒杆菌属和节杆菌属。棒杆菌属由极不相同的细菌群组成，包括动物和植物病原体及腐生菌，如白喉棒杆菌（*C. diphtheriae*）就是致病菌（白喉，见 26.3 节）。节杆菌属主要由土壤微生物组成，其与棒杆菌属的区分依据是，在发育周期中节杆菌属的细胞形态由杆状变为球状，又由球状变为杆状（图 12.67）。但是也有些棒杆菌是多形态的，并在生长过程中形成球状体。因此，根据生活史的不同区分这两个属并不是绝对的。棒杆菌属细胞常常具有膨大的末端，呈棒状（该属名由此得来：*koryne* 是“棍棒”的希腊字），节杆菌呈棒状者较为少见。

节杆菌属细菌是所有的土壤细菌中最为常见的细菌。尽管它们不形成芽孢或其他休眠细胞，它们对干燥和饥饿的抵抗力十分显著。节杆菌属是一群不均一的细菌，营养易变性很大，曾经分离得到能分解除草剂、咖啡因、尼古丁、苯酚和其他特殊化合物的菌株。

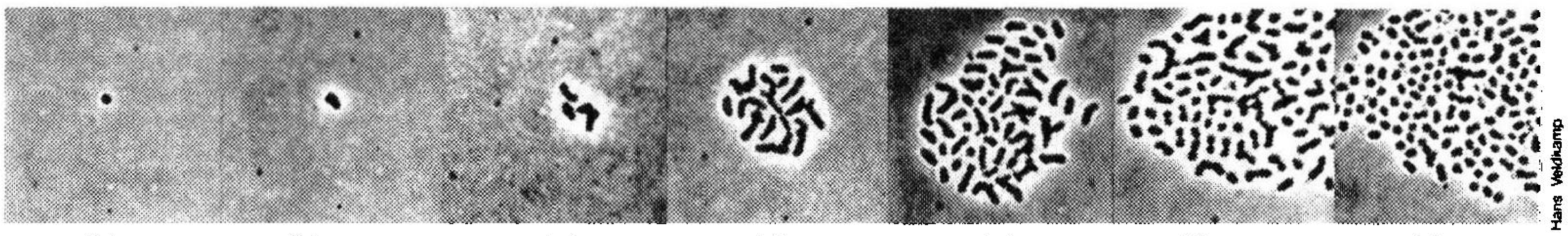


(a)



(b)

图 12.66 节杆菌（*Arthrobacter*）的细胞分裂。成晶节杆菌（*Arthrobacter crystallopoietes*）细胞分裂的电子显微照片，表明折断分裂和 V 形细胞群是如何产生的。(a) 外层胞壁破裂之前（箭头处）。(b) 外层一侧破裂之后，细胞直径为 0. 9～1μm。



(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)

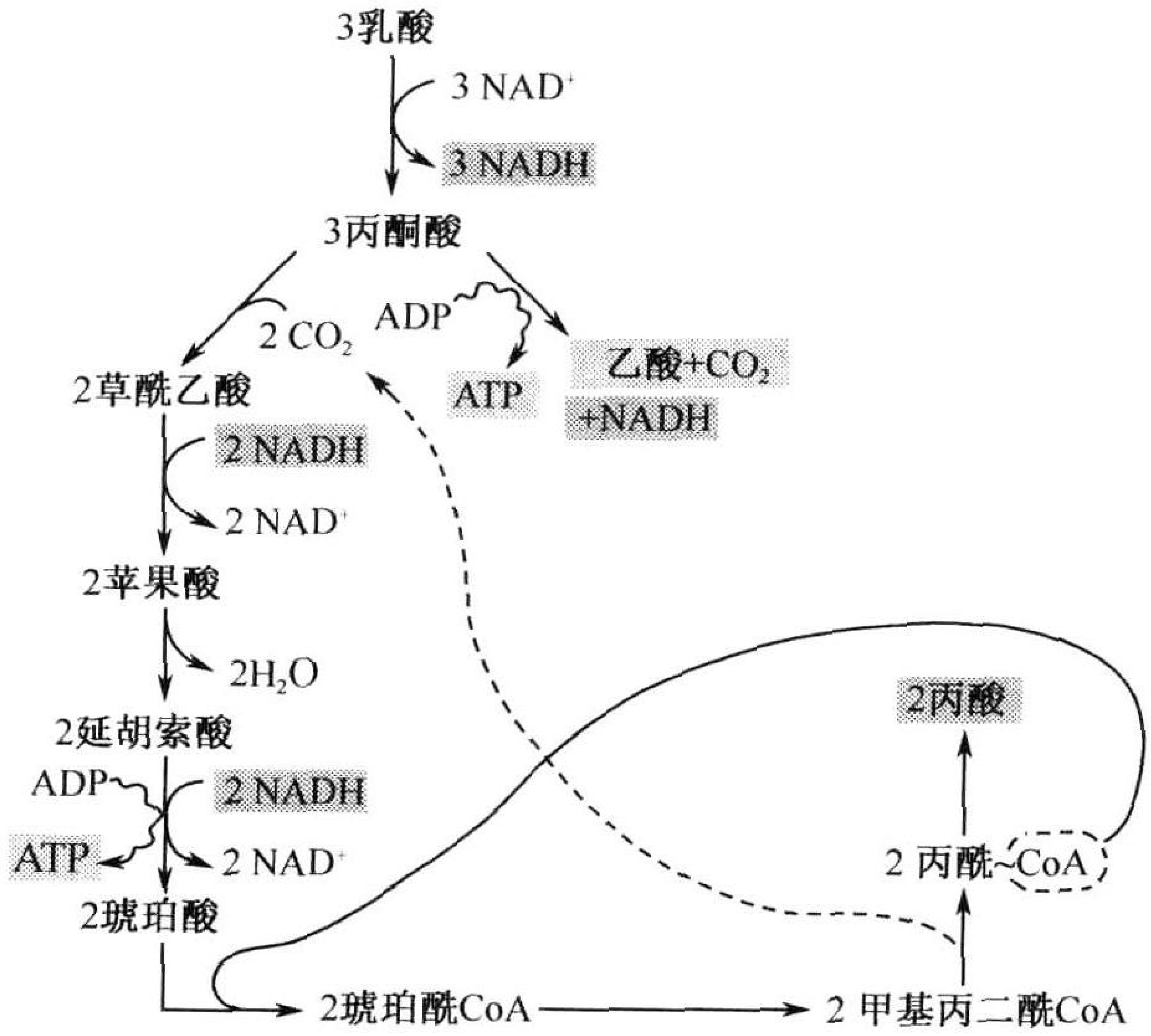
图 12.67 载玻片培养物中观察球形节杆菌（*Arthrobacter*）生活史各阶段。(a) 单球形体。(b)～(c) 球菌变为杆菌，长成的小菌落主要由杆菌组成。(f)～(g) 杆菌变为球菌，细胞直径为 0. 9μm。

丙酸细菌

丙酸细菌（丙酸杆菌属）是在瑞士乳酪中发现的一种细菌。在干酪中，它们的发酵产物由 CO_2形成特征性的小孔，丙酸的存在是干酪具有独特风味的成因之一。尽管一些其他细菌也可产生丙酸，但丙酸细菌产生大量的丙酸却是本属的区别性特征。这一群细菌是革兰氏阳性、多形性无芽孢的杆菌，不运动、厌氧。它们发酵乳酸、碳水化合物和多元醇，产生丙酸、琥珀酸、乙酸和 CO_2。它们的营养需求复杂，一般生长相当缓慢。

从图 12. 68 可以看到从葡萄糖到丙酸的酶促反应。葡萄糖到丙酮酸的最初分解代谢，和乳酸细菌一样，都是按照 EMP 途径进行的，但是，形成的 NADH 作为产生丙酸周期中的一部分再度被氧化。丙酮酸通过转羧基酶反应接受来自甲基的二酸单酰

CoA 的一个羧基，促使形成草酰乙酸和丙酰 CoA。后一物质通过 CoA 转移酶所催化的步骤同琥珀酸发生反应，产生琥珀酰 CoA 和丙酸。然后琥珀酰 CoA 被异构化为甲基丙二酸单酰 CoA，至此周期就告完成（图 12.68）。NADH 的再度氧化出现在草酰乙酸和琥珀酸之间的步骤中，由此氧化还原平衡得到恢复。



化学式：

3 乳酸 ⟶ 2 丙酸 + 乙酸 + CO_2 + 3~5ATP

图 12.68　丙酸杆菌（*Propionibacterium*）利用乳酸产生丙酸。注意 3 分子乳酸氧化为 2 分子丙酮酸盐/醋酸盐＋CO_2产生的 4 分子 NADH 在草酰乙酸和延胡索酸盐的再生中又被重新氧化。同时，还要注意从丙酰 CoA 中来的 CoA 基团在丙酸形成的过程中以能量中和方式被转移给琥珀酸盐。

大多数丙酸细菌也发酵乳酸产生丙酸、乙酸和 CO_2。乳酸厌氧发酵产生丙酸是有意义的，因为乳酸本身是许多细菌发酵的终产物（见 12.19 节）。因而丙酸细菌在厌氧条件下能从其他细菌的初级发酵产物进行“第二次发酵”以获得能量。

乳酸发酵生成丙酸在瑞士乳酪制造中有重要意义。初始培养物由同型发酵的链球菌、乳酸杆菌、外加丙酸细菌的混合物组成。在形成凝固乳酪过程中，乳糖最初发酵为乳酸是由同型发酵菌来实现的。在凝固乳酪空干之后，丙酸细菌迅速的繁殖。瑞士乳酪上的“洞”是由于凝固乳酪中有 CO_2 聚积造成的，气体在乳酪中扩散并在薄弱的地方聚集起来。在发酵过程中，乳酸被氧化成丙酮酸，由此再转变为丙酸（图 12.68）。

产丙酸菌属在发酵的过程中还产生琥珀酸盐，这些细菌在系统发育和生态学上与丙酸杆菌属是不相关的，但是它们在发酵产生能量这方面却有很大的意义。我们将在 17.20 节讨论产丙酸菌属的发酵机制（见 17.20 节）。

12.23 放线菌门：分枝杆菌属

代表属：分枝杆菌属（*Mycobacterium*）

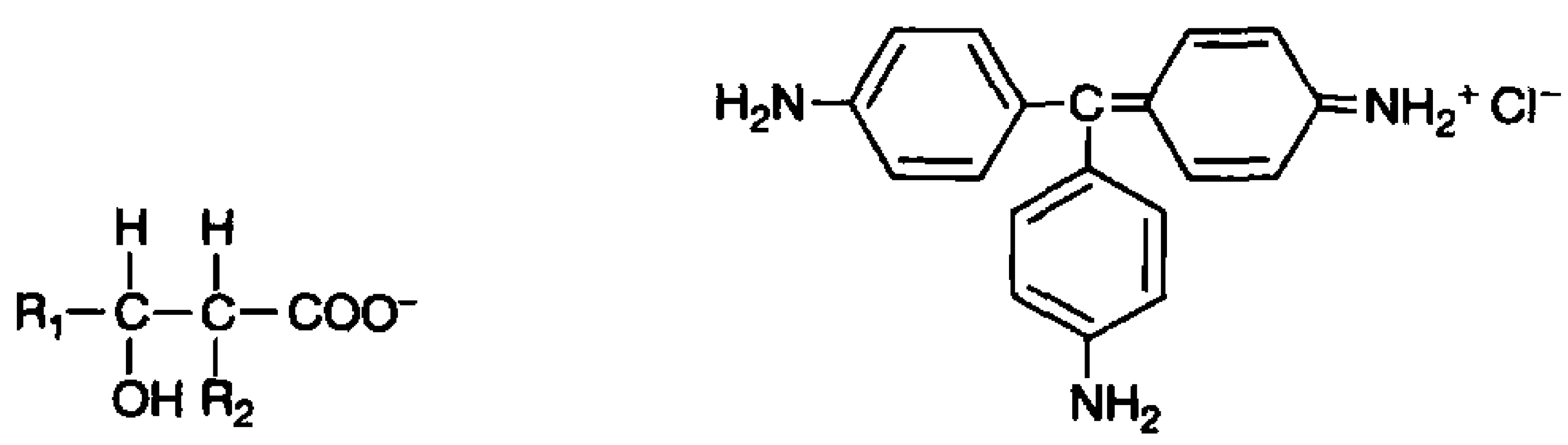
分枝杆菌属是一类杆状细菌，它们在生活史中出现一种特异的染色性质，称为抗酸

性（acid-fastness）。这是因为分枝杆菌属细胞表面有着特殊的脂类成分，称为分枝菌酸（mycolic acid）。这种成分只在分枝杆菌中被发现。这一现象最初是由 Robert Koch 对结核菌进行开创性研究中发现的（见 1.6 节），这一染色性质使人们能够鉴定结核病灶中的微生物；而且也为分枝杆菌的确立提供了重要的分类依据。

抗酸染色

抗酸染色法使用碱性品红和石炭酸染料混合物，将载玻片缓慢加热至熔点 2～3min 以使染料进入细胞。石炭酸能够促使品红渗透到脂质中。用蒸馏水冲洗之后，再用酸性乙醇脱色（3%HCl 加入到 95%乙醇中）；这种方法可将其他菌的品红染料去除，但是分枝杆菌仍然能保持染料。用水冲洗后再用美蓝复染。抗酸染色的微生物最后呈红色。而本底对照和非抗酸染色的微生物呈蓝色（图 26.7）。

正如前面所强调的，具抗酸染色特性的微生物所必需的主要成分是分枝菌酸。该酸实际上是一组复杂分支链的羟基脂类，其结构见图 12.69a。分枝菌酸的羧酸基团一定是自由的基团（非酯化），它与品红染料的碱性基团发生一对一的反应（图 12.69b），分枝菌酸与分枝菌细胞壁上的肽聚糖结合，形成的复合物在脱色时能够以某种方式阻止酸性乙醇的作用。分枝杆菌不能有效地进行革兰氏染色可能是细胞表面含有大量脂类的缘故。如果用碱性乙醇除去这些脂类，细胞就变为酸性褪色，因而使革兰氏染色呈现阳性。



(a)分枝菌酸：R_1和R_2是长链脂肪烃　　(b)碱性品红

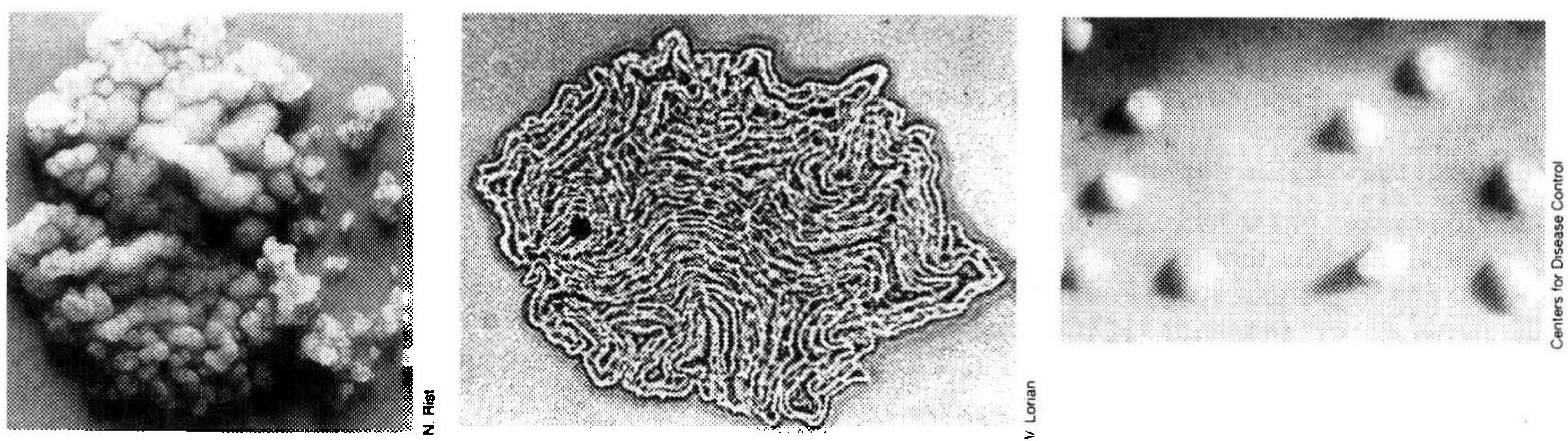
图 12.69 酸性乙醇染色法。 (a) 分枝菌酸的结构。(b) 酸性乙醇不使染料中的碱性品红褪色。品红染料可能是通过 COO^- 和 NH_2^+ 的离子键与分枝菌酸相结合。

分枝杆菌属的特征

分枝杆菌也是多形性的，在生长中会出现分枝或丝状阶段。但与放线菌不同的是（见 12.24 节），分枝杆菌属的丝状体在轻微摇动时会分裂为杆状体或球状体，并不形成真正的菌丝体。通常，分枝杆菌被分为两大类，缓慢生长型和快速生长型的分枝杆菌（表 12.29）。结核分枝杆菌是典型的缓慢生长菌，培养物稀释以后要几天到几个星期才能长出可见的菌落（Koch 能成功地分离出结核分枝杆菌正是因为他等待了足够长的时间；见 1.6 节）。在固体培养基上，分枝杆菌的菌落常常坚固、致密、有褶皱（图 12.70a），这样的菌落形态可能是由于细胞表面有高含量脂类及疏水结构造成的。

表 12.29　有代表性的分枝杆菌的一些特征

种	5%NaCl 中生长	硝酸盐 降解	45℃ 生长	对人的 致病性	色素 产生
缓慢生长的种					
结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）	−	+	−	+	无
鸟分枝杆菌（*Mycobacterium avium*）	−	−	−	+	成熟菌落产生色素（图12.70c）
牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）	−	−	+	+	无
堪萨斯分枝杆菌（*Mycobacterium kansasii*）	−	+	−	+	光致色变性
快速生长的种					
耻垢分枝杆菌（*Mycobacterium smegmatis*）	+	+	+	−	无
草分枝杆菌（*Mycobacterium phlei*）	+	+	+	−	产色素
龟分枝杆菌（*Mycobacterium chelonae*）	+	−	−	+	无
副偶然分枝杆菌（*Mycobacterium parafortuitum*）	+	+	−	−	光致色变性



(a)　(b)　(c)

图 12.70　分枝杆菌（*Mycobacterium*）的特征性菌落形态。（a）结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*），显示菌落致密、卷曲，菌落直径为 7mm。（b）结核分枝杆菌毒株的早期菌落，表示也有的梭状生长，单个细胞直径约为 0.5μm（可参见 Robert Koch 提供的结核分枝杆菌的图片，图 1.23）。（c）鸟分枝杆菌（*M. avium*）菌落，该株是从 AIDS 患者的机会感染病原体中分离出来的。

分枝杆菌的营养需求比较简单。在以铵盐为氮源，甘油或醋酸盐作碳源和电子供体的简单无机盐培养基中进行通气培养就可以生长。脂类和脂肪酸有促进生长的作用，把卵黄加入培养基中往往可以使其较为丰富的生长。从病原材料中初次分离结核分枝杆菌时，往往使用甘油卵黄培养基（Lowenstein-Jensen 培养基）。

或许是由于结核分枝杆菌的细胞壁的脂类含量高，能使该菌长时间地抵抗像碱或苯酚这样一类的化学物质。这一特性被用来从含有其他细菌的痰液和其他材料中进行结核杆菌的选择性分离。首先，用 1mol/L NaOH 将痰液处理 30min，再中和痰液并在分离培养基上进行划线接种。

许多分枝杆菌都能产生黄色的类胡萝卜素（图 12.70c）。依据色素产生的情况，可将分枝杆菌分为 3 个类群：不产色素的类群［包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌（*M. bovis*）］；只在可见光培养时才产生色素的类群，这种性质被称为光致色变性（*Photo-*

chromogenesis）［包括堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、瘰疬分枝杆菌（*M. marinum*）］；在黑暗中培养时也能产生色素的类群，即具有暗产色性（*Scotochromogenesis*）［包括戈登分枝杆菌（*M. gordonae*）、石蜡分枝杆菌（*M. paraffinicum*）］（表12.29）。光诱导生成类胡萝卜素过程中需要短波段（蓝）光，且仅在有氧情况下发生。已证实光诱导作用是一种光催化氧化反应，而且类胡萝卜素生物合成中的一种早期酶是受光诱导的。像其他有类胡萝卜素的细菌一样，类胡萝卜素能够保护分枝杆菌免受氧化损伤（见6.16节）。

在琼脂或液体培养基中生长的有毒力的菌株能形成长索状结构（图12.70b），这是由于肩并肩的细菌聚集在一起和细菌长链缠绕的结果。索状生长反映了细胞表面上有特征性的脂类存在，即"索状因子"（图12.71），它是一种糖脂。结核病将在26.5节中讨论。

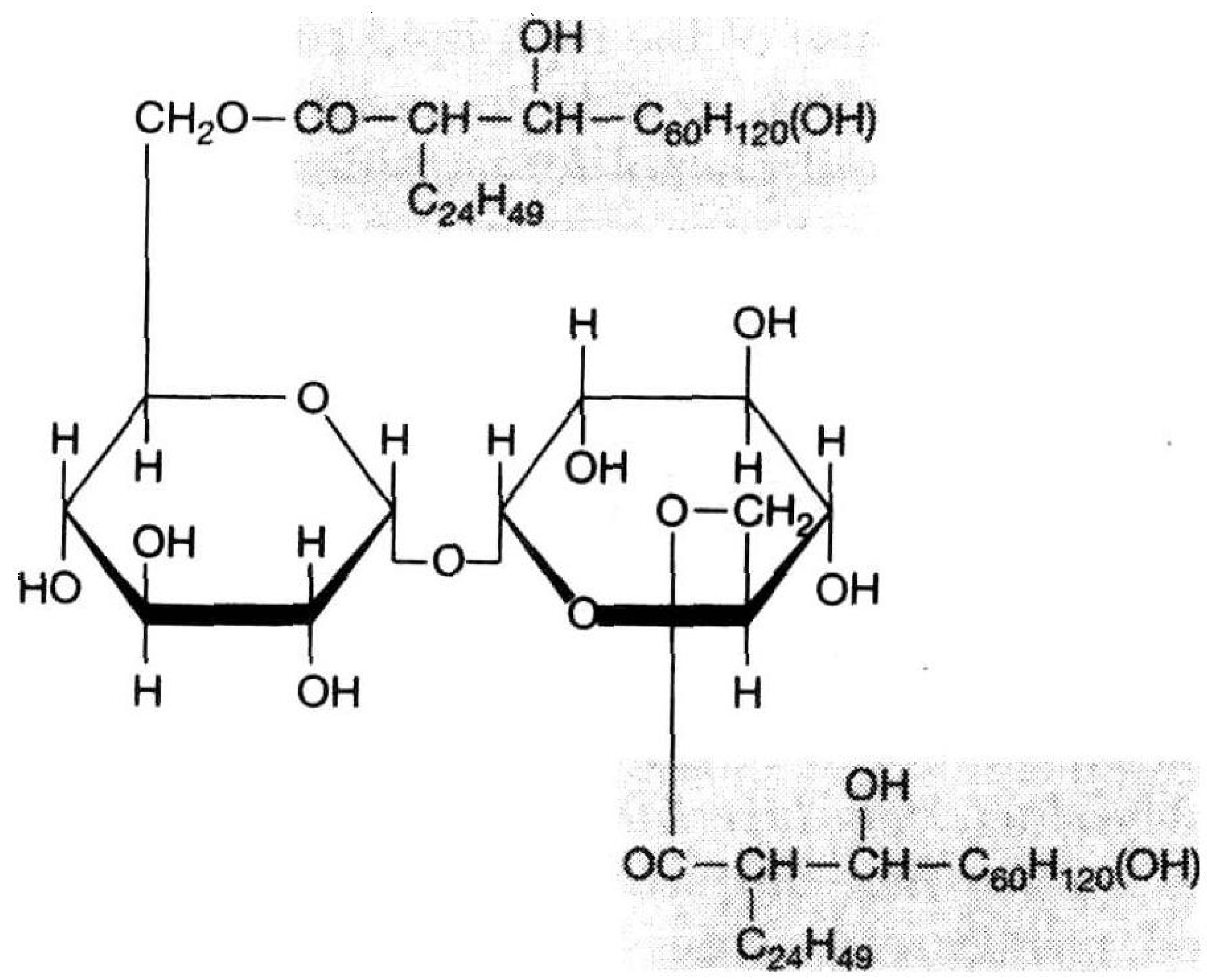


图12.71 索状因子的结构，分枝杆菌（*Mycobacterium*）的一种糖脂：6,6′-双分枝海藻糖（6,6′-dimycolytrehalose）。两个相同的长链双醇基团用方框表示。

概念检查

高GC含量的革兰氏阳性菌，像棒杆菌属（*Corynebacterium*）、节杆菌属（*Arthrobacter*）、丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）和分枝杆菌（*Mycobacterium*）。它们主要是无害的土壤腐生菌。而结核分枝杆菌则能导致肺结核。结核分枝杆菌外膜光滑富含脂质，需经特殊的染色方法（抗酸染色）来观察细胞的显微结构。

◆ 什么是折断分裂（snapping division）？何种微生物进行此种繁殖？

◆ 在制作瑞士硬干酪的过程中需要什么微生物？什么化学物质使其增加风味，产生小孔？

◆ 什么是分枝菌酸？由何种微生物产生？它对菌体有何作用？

12.24 丝状放线菌、链霉菌和其他放线菌

代表属：链霉菌属（*Streptomyces*）、放线菌属（*Actinomyces*）

放线菌是一大群丝状的、能形成分枝菌丝的革兰氏阳性菌。不断生长和分枝的结果是形成一种叫做菌丝体（mycelium）的分枝网状丝状体组织（图 12.72）。虽然它是由细菌产生的，但是它类似于真菌产生的菌丝体（图 14.25）。

大部分放线菌都形成孢子，孢子的形成方式不同，用以区分各亚群，见表 12.30。大部分放线菌其基因组 GC 含量在 63%～78%，在系统发育上，丝状放线菌形成一个紧密的群体。因此，菌丝体的形成和孢子形成无论在系统进化上还是在分类上都是极其重要的。这里我们着重介绍链霉菌属。

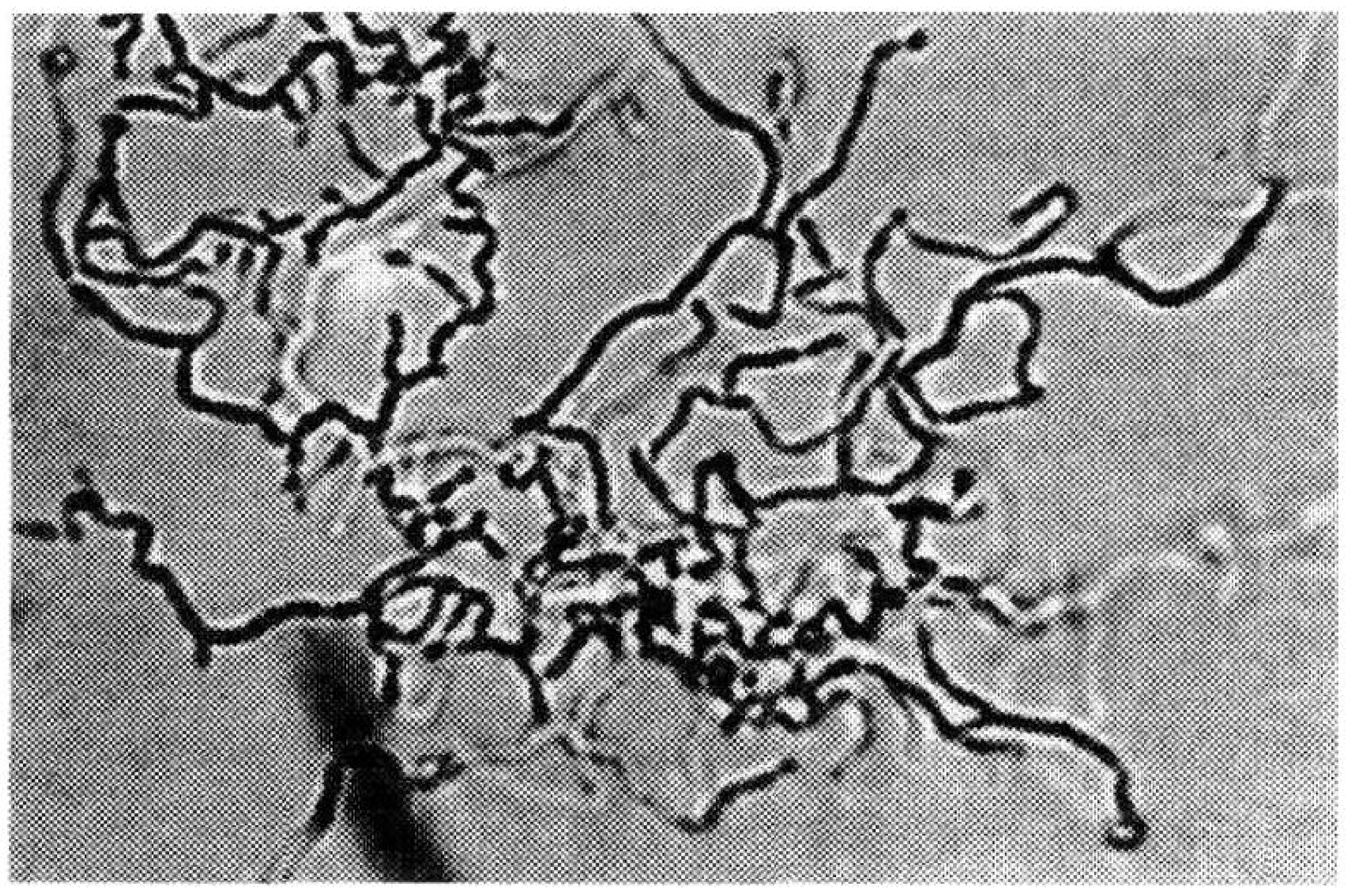


图 12.72　诺卡氏菌属（*Nocardia*）。 放线菌诺卡氏菌属的幼小菌落表示典型的丝状细胞结构（菌丝体），每个菌丝体直径 0.8～1.0μm。

表 12.30　放线菌中放线菌属和相关属的代表菌（所有革兰氏阳性菌）[a]

主要类群	DNA/(mol%GC)
棒状细菌类群：杆状，常呈棒状，形态多样；没有抗酸性或丝状体；细胞折断分裂	
棒杆菌属（*Corynebacterium*）：不规则染色节段，有时呈颗粒状；棒状细菌经常膨胀；动物和植物病原体，也是土壤腐生细菌	51～65
节杆菌属（*Arthrobacter*）：球形-杆状多形性变化；土壤细菌	59～70
纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）：棒状；能消化纤维素，兼性好氧	71～73
库特氏菌属（*Kurthia*）：杆状，链末端钝圆；后期形成球状体	36～38
短杆菌属（*Brevibacterium*）：球形-杆状多形性变化；乳酪，皮肤	60～67
丙酸细菌：厌氧到耐氧；杆状或丝状，有分枝	
丙酸杆菌（*Propionibacterium*）：不运动；厌氧到耐氧；产生丙酸和乙酸；乳制品（瑞士乳酪）；皮肤，可能是致病菌	53～68
真杆菌属（*Eubacterium*）：专性厌氧；产生有机酸混合物，包括丁酸、乙酸、甲酸和乳酸；肠道，感染软组织，土壤；可能是致病菌；可能是肠道菌群中的优势菌	26～48
专性厌氧菌	
双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）：光滑的小菌落，没有丝状体；通常为棒状细胞；在母乳喂养的婴儿肠道里发现	55～67
醋杆菌属（*Acetobacterium*）：同型乙酸细菌；沉积物和污水	39～43
丁酸弧菌属（*Butyrivibrio*）：弯曲的杆状；瘤胃	36～42
热厌氧菌属（*Thermoanaerobacter*）：杆状，嗜热，温泉	37～39
放线菌：丝状，经常分枝；高度多样性	
类群Ⅰ. 放线菌群：无酸性乙醇抗性；兼性好氧；不形成菌丝体；能形成分枝丝状体；杆状，球状体，或棒状细菌	
放线菌属（*Actinomyces*）：厌氧到兼性好氧；丝状小菌落，但丝状体时期很短，断裂成棒状细菌；对人或动物可能有致病性；在口腔中发现	57～69

续表

主要类群	DNA/(mol%GC)
其他属：蛛菌属（*Arachnia*）、丝杆菌属（*Bacterionema*）、罗氏菌属（*Rothia*）、土壤霉菌属（*Agromyces*）	
类群Ⅱ. 分枝细菌：酸性乙醇抗性，丝状体期短暂	
分枝杆菌属（*Mycobacterium*）：病原菌，腐生菌；专性好氧；细胞和细胞壁脂质含量高；细胞增大，分枝菌酸；营养简单；生长缓慢；结核病，麻风病，肉芽肿，鸟的结核病；也是土壤细菌；能氧化碳氢化合物	62～70
类群Ⅲ. 固氮放线菌：植物共生固氮菌；产生真正的菌丝体	
弗兰克氏菌属（*Frankia*）：在多种植物根部形成两种类型的根瘤；可能是微好气菌；生长缓慢；固定 N_2	67～72
类群Ⅳ. 游动放线菌：生成真正的菌丝体；有孢子囊	
游动放线菌属（*Acyinoplanes*）、链胞囊菌属（*Streptosporangium*）	69～71
类群Ⅴ. 嗜皮菌群：菌丝体至少按两个平面垂直分裂，形成大量可运动的球状体；无气生菌丝；偶尔引起表皮感染	
嗜皮菌属（*Dermatophilus*）、地嗜皮菌属（*Geodermatophilus*）	56～75
类群Ⅵ. 诺卡氏菌：菌丝体断裂形成球状体或长形菌体；常生成气生孢子；有时有酸性乙醇抗性	
诺卡氏菌属（*Nocardia*）：多为土壤细菌；专性好氧；能利用多种碳氢化合物	61～72
红球菌属（*Rhodococcus*）：土壤腐生菌，常见于各种昆虫的中肠里；能利用碳氢化合物	59～69
类群Ⅶ. 链霉菌：菌丝体保持完整；有丰富的气生菌丝和长孢子链	
链霉菌属（*Streptomyce*）：有近 500 个已鉴定的种，许多能产抗生素	69～75
其他属（形态上有差异）：链轮丝菌属（*Streptoverticillium*）、鱼孢菌属（*Sporichthya*）、*Microcellobosporia*、北里氏菌属（*Kitasatoa*）、钦氏菌属（*Chainia*）	67～73
类群Ⅷ. 小单孢菌群：菌丝体保持完整；孢子单个的，成对的或以短链形成；有些嗜热；土壤中。腐烂植物碎片中发现的腐生菌；有些种产生内生孢子	
小单孢菌属（*Micromonospora*）、嗜热放线菌属（*Thermoactinomyces*）、嗜热单孢菌属（*Thermomonospora*）	54～79

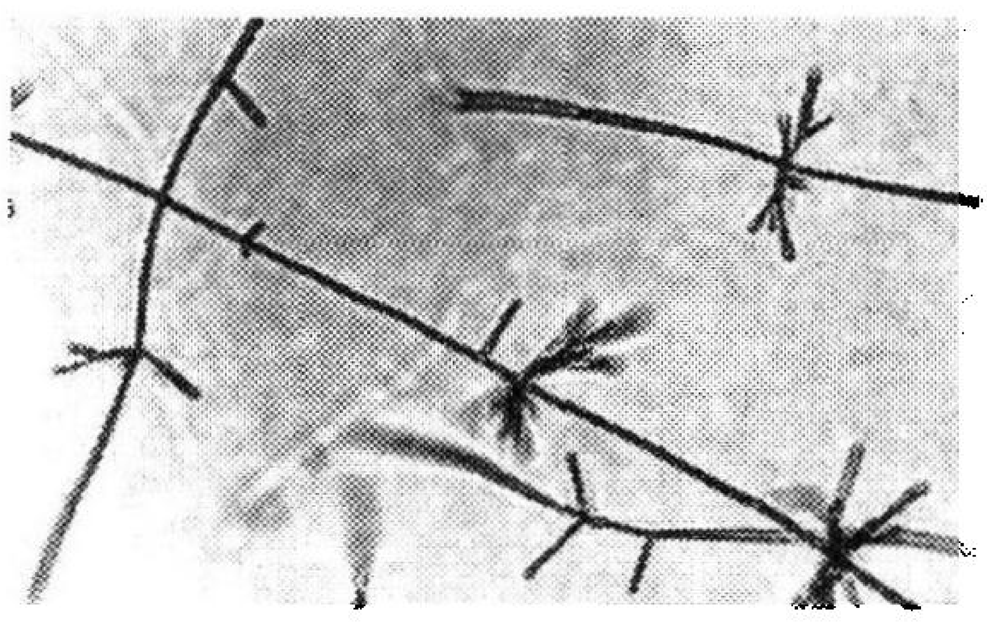
a. 系统进化学中，常将除醋杆菌属、丁酸弧菌属和热厌氧菌属外的所有的种都归入放线菌。

链霉菌属

链霉菌包含许多不同的种和变种。虽然它的 GC 含量的范围只有 69%～73%，但它包括 500 多个种。链霉菌丝状体直径是 0.5～1.0μm，长短不一，营养菌丝常常缺横隔。

链霉菌菌丝顶端的生长通常是分枝生长。因此，在生长期间紧密缠绕的复杂的菌丝形成了后来盘曲很紧的菌丝体及菌落。随着菌落的成熟会出现特有的气生菌丝，称为孢子梗（sporphore），突出于菌落表面之上并产生孢子（图 12.73）。链霉菌孢子一般被称为分生孢子（conidia），这种孢子无论从哪一方面来说，都与芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属的内生孢子无关，因为链霉菌的孢子完全是由多核气生菌丝生成横隔，随后分为单个细胞直接成为孢子（图 12.74）。

不同种之间气生菌丝形状和排列的不同及带孢子结构差异是链霉菌属的分类依据（图 12.75）。分生孢子和气生菌丝通常产色素，使成熟的菌落有特殊的颜色（图 12.76a）。成熟菌落呈灰土色，它的紧密性和它的颜色，使得在琼脂板上检测链霉菌落



(a)



(b)

图 12.73　放线菌纲中几种产孢子结构的显微照片。(a) 链霉菌 (*Streptomyces*)，单轮生类型。(b) 链霉菌，闭合螺旋形类型。菌丝宽度均为 0.8μm。与图 12.75 对比。

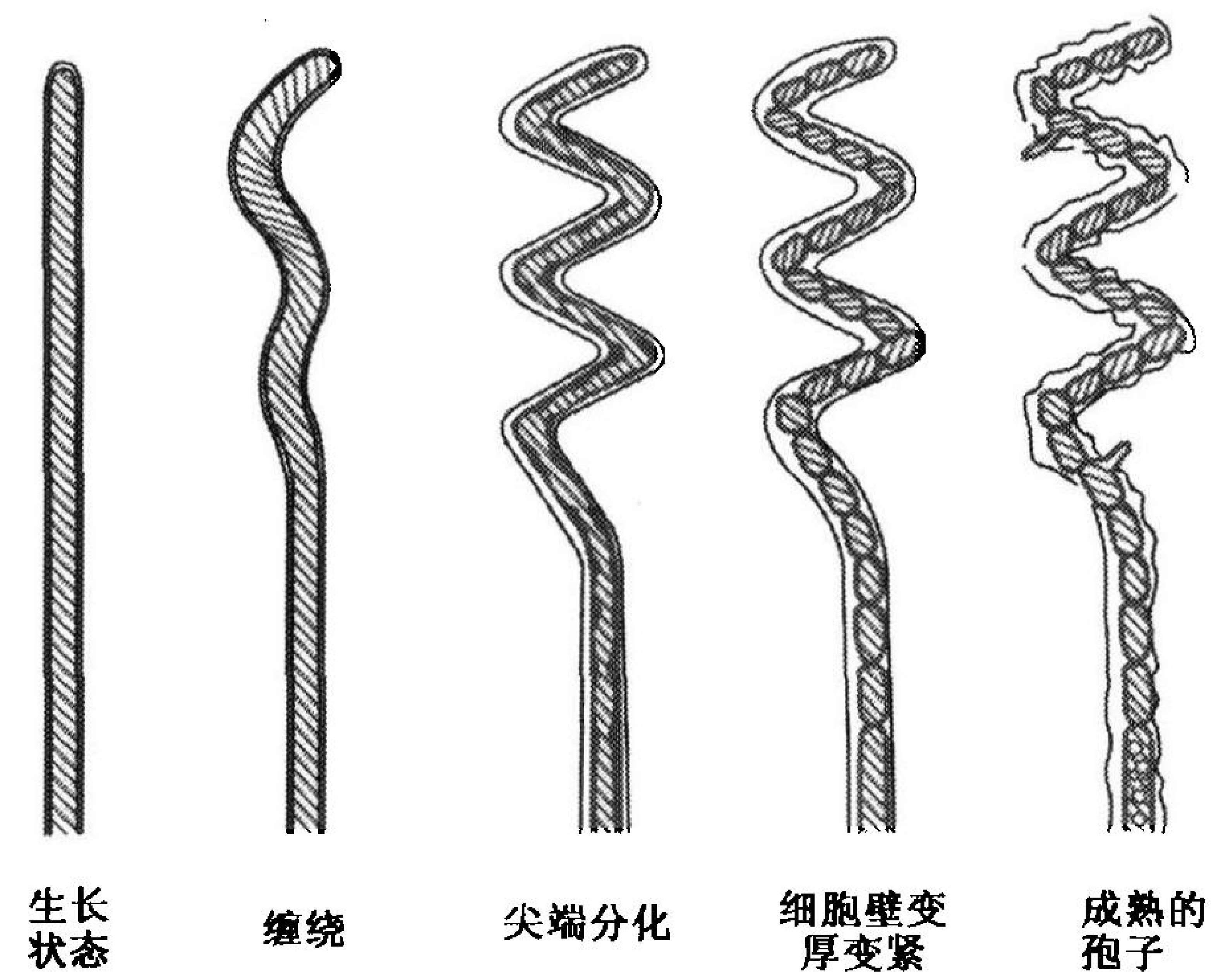


图 12.74　链霉菌的芽孢形成。链霉菌气生菌丝转变为分生孢子的各步图解。

相对简单（图 12.76b）。

链霉菌的生态学和分离

虽然，一些链霉菌可见于水生环境，但是它们主要是土壤微生物。事实上，土壤特有的气味就是由于链霉菌代谢产生的一系列土臭味素（geosmin）引起的。它们是含有不饱和碳、氧、氢的杂环倍半萜类化合物。最早发现的土臭味素是反式-1,10-二甲基-反式-9-萘烷酮。一些蓝细菌也能产生土臭味素（见 12.25 节）。

碱性和中性土壤比酸性土壤对链霉菌的发育更为有利。大量链霉菌生长于干燥的土壤中（像沙质肥土，覆盖有石灰石的土壤），相比于其他土壤细菌，链霉菌的需水量较低。从土壤中分离链霉菌是比较容易的：用无菌水稀释土壤悬液，涂布于选择性的琼脂培养基，25℃培养（图 30.7a）。这种选择性的培养基含有各种无机盐，加入淀粉，天



图 12.75 链霉菌不同类型孢子的着生结构。一种链霉菌只有一种孢子着生结构。与图 12.73 相对比。

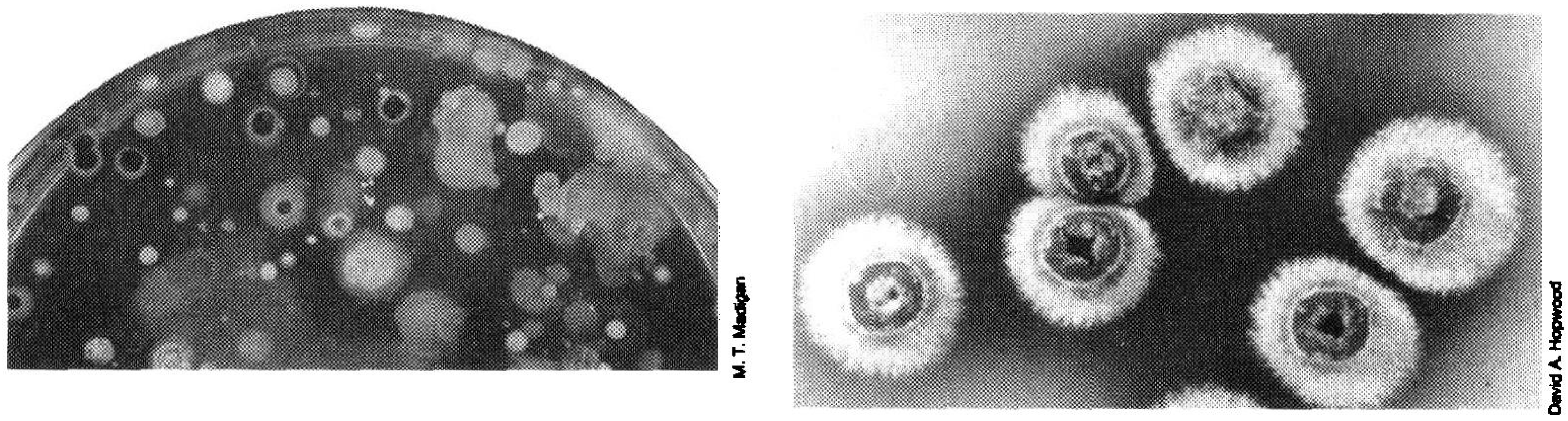
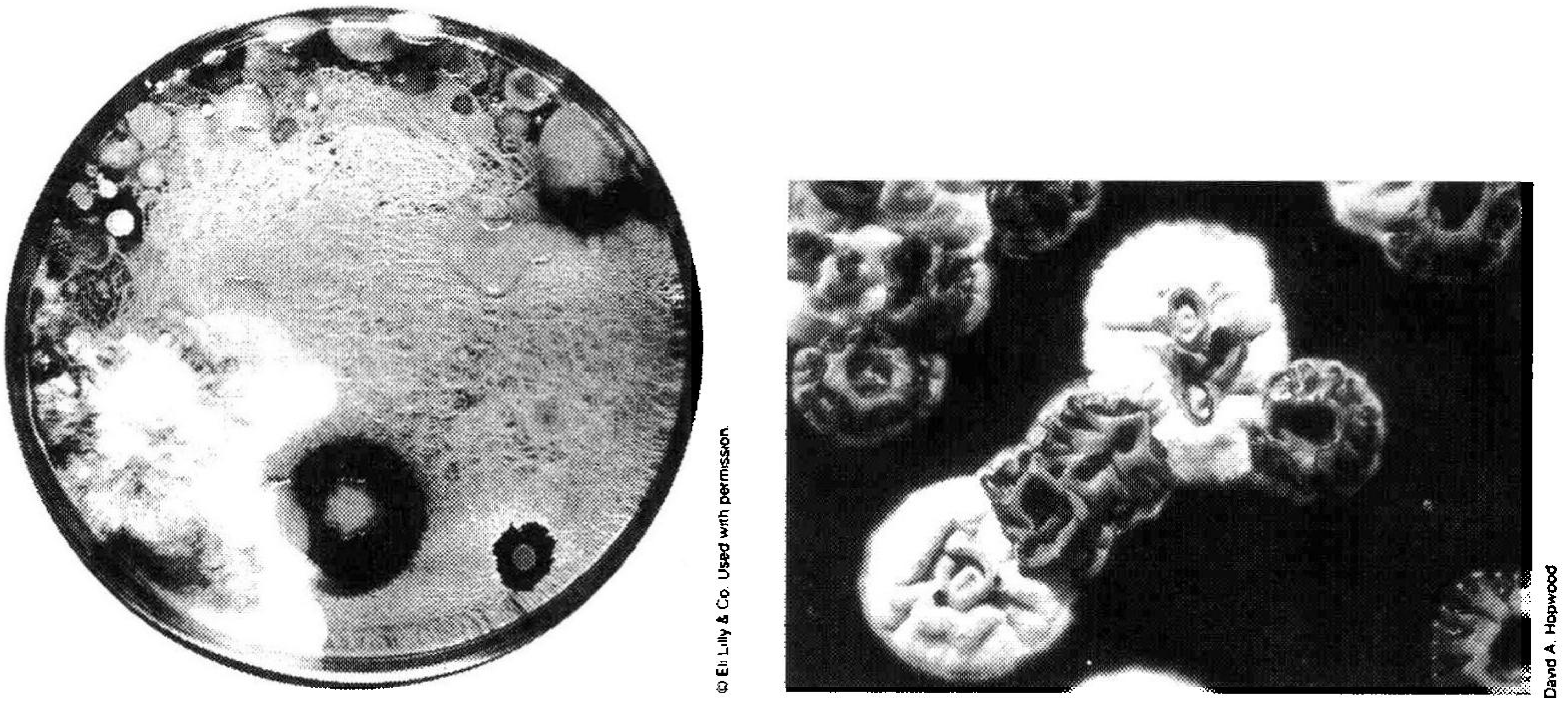


图 12.76 链霉菌。(a) 由土壤稀释液涂布酪素琼脂平板得到的链霉菌和其他菌落，链霉菌菌落有许多不同的颜色（从图中可见一些黑色链霉菌落），但它不透明，表面粗糙，不扩散，很容易被检出。(b)天蓝色链霉菌（*Streptomyces coelicolor*）菌落的近距离照片。

冬酰氨或苹果酸钙作碳源，未消化的酪蛋白或硝酸钾作氮源。培养 5～7 天后，检查平板有无特征性的链霉菌菌落（图 12.76 和图 12.77），对感兴趣的菌落，将其孢子进行划线接种，由此分离出纯培养物。

链霉菌对营养的需求是多种多样的。很少需要生长因子，可利用多种碳源，像糖



(a)　　　　　　　　　　(b)

图 12.77　链霉菌产生的抗生素。（a）土壤微生物在平板上显示出的抗性。周围有抑菌区的较小的菌落是链霉菌；较大的扩散性的菌落是杆菌。（b）链霉菌正在分泌红色的抗生素即十一烷基灵菌红素。

类、醇类、有机酸、氨基酸和一些芳香族化合物。大部分分离物产生胞外水解酶，能催化利用多糖（淀粉、纤维素、半纤维素）、蛋白质和脂类，一些菌株还能利用烃类、木质素、丹宁酸，甚至橡胶。在含有酪蛋白或淀粉的碱性琼脂平板上涂布土壤稀释液通常就能获得链霉菌（图 12.76a）。一株菌可利用 50 多种不同的碳源。

链霉菌是严格的好氧菌，向其液体培养基中通气，其生长速度明显变快。在液体培养基中链霉菌通常不形成孢子，在琼脂或其他固体培养基中形成孢子；但是，如果是静置培养，菌体在液体培养基表面形成一层薄膜，就会产生孢子。

链霉菌产生的抗生素

也许链霉菌最显著的特性就是其产生抗生素的范围（表 12.31）。在用作最初分离的琼脂板上常常见到链霉菌产生抗生素的证据：靠近其他细菌的菌落显现出抑菌区（图 12.76、图 12.77a 和图 30.7a）。研究证明，在所分离的全部链霉菌中将近 50%是抗生素产生菌。

由于链霉菌抗生素的巨大经济意义和医学意义，对这些菌株进行了大量的研究。目前已发现链霉菌可产生 500 多种抗生素，其中大部分已作化学分析（图 12.77b）。有些细菌产生不止一种抗生素，通常一种细菌产生的多种抗生素，它们在化学上并无相关性。同样，由世界许多不同地区发现的不同菌种也可能产生同一种抗生素。虽然产生抗生素的菌株对其产生的抗生素具有抗性，但它对其他链霉菌产生的抗生素通常很敏感。有关抗生素合成的酶需要许多基因编码，因此，链霉菌的基因组通常很大（8Mb 或许更大，表 15.1）。

表 12.31 链霉菌属各种合成的常见抗生素

化学分类	名称	产生菌	抗菌谱[a]
氨基糖苷类	链霉素	灰色链霉菌（*S. griseus*）[b]	多数革兰氏阴性菌
	壮观霉素	链霉菌属（*Streptomyces* spp.）	结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）青霉素产生菌：淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）
	新霉素	弗氏链霉菌（*S. fradiae*）	广谱，因为有毒性通常在局部使用
四环素类	四环素	金霉素链霉菌（*S. aureofaciens*）	广谱，革兰氏阳性和阴性细菌，立克次氏体和衣原体，支原体属（*Mycoplasmas*）
	金霉素	金霉素链霉菌（*S. aureofaciens*）	同四环素
大环内酯类	红霉素	暗红产色链霉菌（*S. erythreus*）	多数为革兰氏阴性菌，常用于有青霉素的地方，军团菌属（*Legionella*）
	氯林肯霉素	林肯链霉菌（*S. lincolnensis*）	对专性厌氧菌，特别是多形拟杆菌有效
多烯类	制霉菌素	诺尔斯氏链霉菌（*S. noursei*）	真菌，特别是念珠菌感染
		结节链霉菌（*S. nodosus*）	真菌
无	氯霉素	委内瑞拉链霉菌（*S. venezuelae*）	广谱，治疗伤寒的可选药物

a. 多数抗生素对几种不同的细菌有效。本表列出某种抗生素的医学应用。许多这些抗生素的结构和作用在20.7～20.9节中讨论。

b. “*S.*”是链霉菌（*Streptomyces*）的缩写。

已有60多种链霉菌抗生素应用于人类，畜牧兽医，农业和工业。一些常用抗生素的链霉菌起源列于表12.31。采用母体分子的化学结构将其分类。由于许多传染性疾病仍不能被已发现的抗生素适当控制，因此寻找新链霉菌抗生素的工作仍在继续。而且，抗生素抗药菌株的出现也需要我们继续寻找新的抗生素。

尽管对产生抗生素的链霉菌进行了大量的研究，但每年获得链霉菌抗生素仍需耗费数十亿美元，对于链霉菌的生态学我们仍然知之甚少。这些链霉菌和其他原核生物的相互作用及在第一时间产生抗生素的生态学原理，我们还不完全清楚。一种关于链霉菌产生抗生素的假说是：抗生素与芽孢形成相关（芽孢是营养匮乏时，自动触发的一种过程），可能是为了抑制与链霉菌竞争有限营养物质的其他细菌的生长。使链霉菌完成产孢过程，进入易存活的休眠状态。

概念检查

链霉菌是一大类细丝状的革兰氏阳性菌，在气生菌丝末端形成孢子。许多临床使用的抗生素，像四环素、新霉素都源自链霉菌。

◆ 链霉菌中的孢子和孢子形成过程与杆状菌有何区别？

◆ 什么能量级的生物是链霉菌，它们从什么化合物中获取能源？

◆ 为什么能产生抗生素是链霉菌的优势？

Ⅳ 门 4：蓝细菌和原绿菌

12.25 蓝细菌

代表属：聚球蓝细菌属（*Synechococcus*）、颤蓝细菌属（*Oscillatoria*）、念珠蓝细菌属（*Nostoc*）

蓝细菌（cyanobacterium）由一群形态各异的光合细菌组成，与紫色细菌和绿色细菌最主要的区别在于它们是产氧光合自养型（见 12.2 节和 12.32 节）。蓝细菌代表着细菌主要系统发育门中的一支，与革兰氏阳性菌亲缘关系较远（图 12.1）。同 11.1 节，这种微生物是地球上第一种释放氧气的光合微生物，把大气从无氧转变成有氧。

蓝细菌的结构与分类

蓝细菌的形态多样性是显著的（图 12.78）。目前已知有单细胞和丝状体两种形态，在这些形态类型中仍存在大量变异。蓝细菌从形态上可分为 5 个类群：①二分裂繁殖的单细胞（图 12.78a）；②多分裂繁殖的单细胞（图 12.78b）；③含有用于氮固定称为异形囊胞（heterocyst）分化细胞的菌丝体（图 12.78d 和图 12.80）；④不形成异形囊胞的丝状体（图 12.78c）；⑤分枝的丝状体（图 12.78e）。表 12.32 中列出了各类群的代表属。蓝细菌细胞大小从典型的细菌型（直径 0.5～1μm）到细胞直径 40μm（*Oscillatoria princes*，图 4.44a）不等。

表 12.32　蓝细菌的种群

类　群	属	DNA/（mol%GC）
类群Ⅰ．单细胞：单细胞或细胞聚集体	黏杆蓝细菌属（*Gloeothece*）（图 12.78a）、黏杆菌属（*Gloeobacter*）、聚球蓝细菌属（*Synechococcus*）、蓝丝菌属（*Cyanothece*）、黏球蓝细菌属（*Gloeocapsa*）、集胞蓝细菌属（*Synechocystis*）、管孢蓝细菌属（*Chamaesiphom*）	35～71
类群Ⅱ．宽球蓝细菌目：通过多分裂产生的称作 baeocyte 的小球形细胞进行繁殖	皮果蓝细菌属（*Dermocarpa*）（图 12.78b）、异球蓝细菌属（*Xenococcus*）、小皮果蓝细菌属（*Dermocarpella*），宽球蓝细菌属（*Pleurocapsa*）、黏八叠球菌属（*Myxosarcina*）、拟色球蓝细菌属（*Chroococcidiopsis*）	40～46
类群Ⅲ．颤蓝细菌目：在一个单一的水平上通过二分裂形成丝状细胞	颤蓝细菌属（*Oscillatoria*）（图 12.78c）、螺旋蓝细菌属（*Spirulina*），节螺蓝细菌属（*Arthrospia*），鞘丝蓝细菌属（*Lyngbya*）、微鞘蓝细菌属（*Microcoleus*）、假鱼腥蓝细菌属（*Pseudanabaena*）	40～67
类群Ⅳ．念珠蓝细菌目：产生异形囊胞的丝状细胞	鱼腥蓝细菌属（*Anabaena*）、念珠蓝细菌属（*Nostoc*）、眉蓝细菌属（*Calothrix*）、节球蓝细菌属（*Nodularia*）、筒孢蓝细菌属（*Cylinodrosperum*）、伪枝蓝细菌属（*Scytonema*）	38～46
类群Ⅴ．分枝：细胞分裂形成分枝	飞氏蓝细菌属（*Fischerella*）、真枝蓝细菌属（*Stigonema*）、拟绿胶蓝细菌属（*Chlorogloeopsis*）、软管蓝细菌属（*Hapalosiphon*）	42～46

蓝细菌细胞壁的结构与革兰氏阴性菌相似，肽聚糖在其细胞壁中可检测到（图12.79）。许多蓝细菌产生大量的黏质外膜或鞘，使成群细胞或丝状体黏附在一起（图12.78a）。光合作用的膜系统通常是复杂且多层次的（图17.10b），尽管在一些低级蓝细菌中，光合菌片层膜结构是有规律的以同心圆的方式循环排列在细胞质外周（图12.79）。

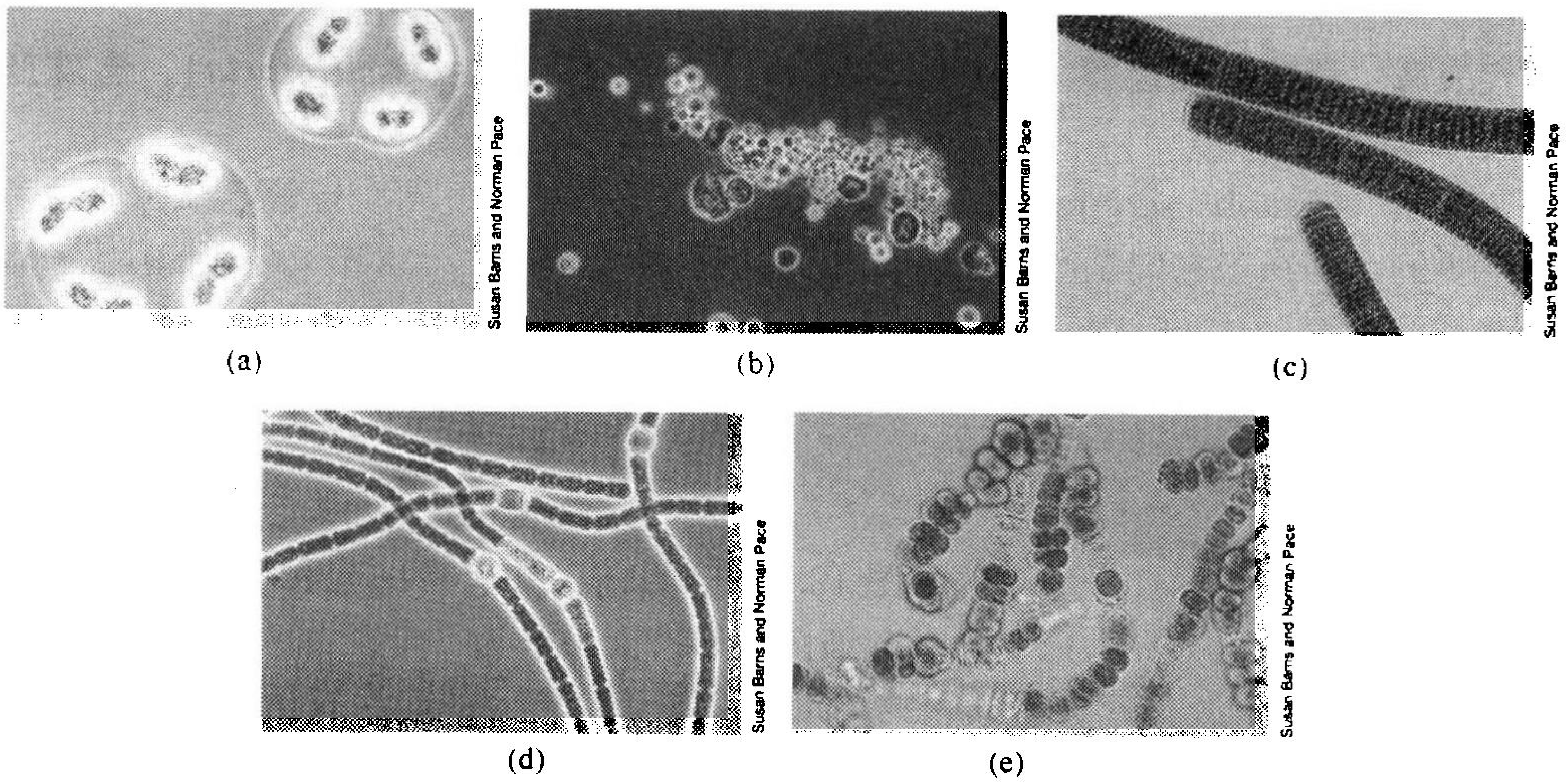


图 12.78 蓝细菌的形态多样性：5 种不同的形态类型。（a）单细胞，黏杆蓝细菌属（*Gloeothece*），细胞直径为 5～6μm。（b）群体，皮果蓝细菌属（*Dermocarpa*）。（c）菌丝体，颤蓝细菌属（*Oscillatoria*），细胞宽约 15μm。（d）异形囊胞菌丝体，鱼腥蓝细菌属（*Anabaena*），细胞宽约 5μm。（e）分枝菌丝体，飞氏蓝细菌属（*Fischerella*）。

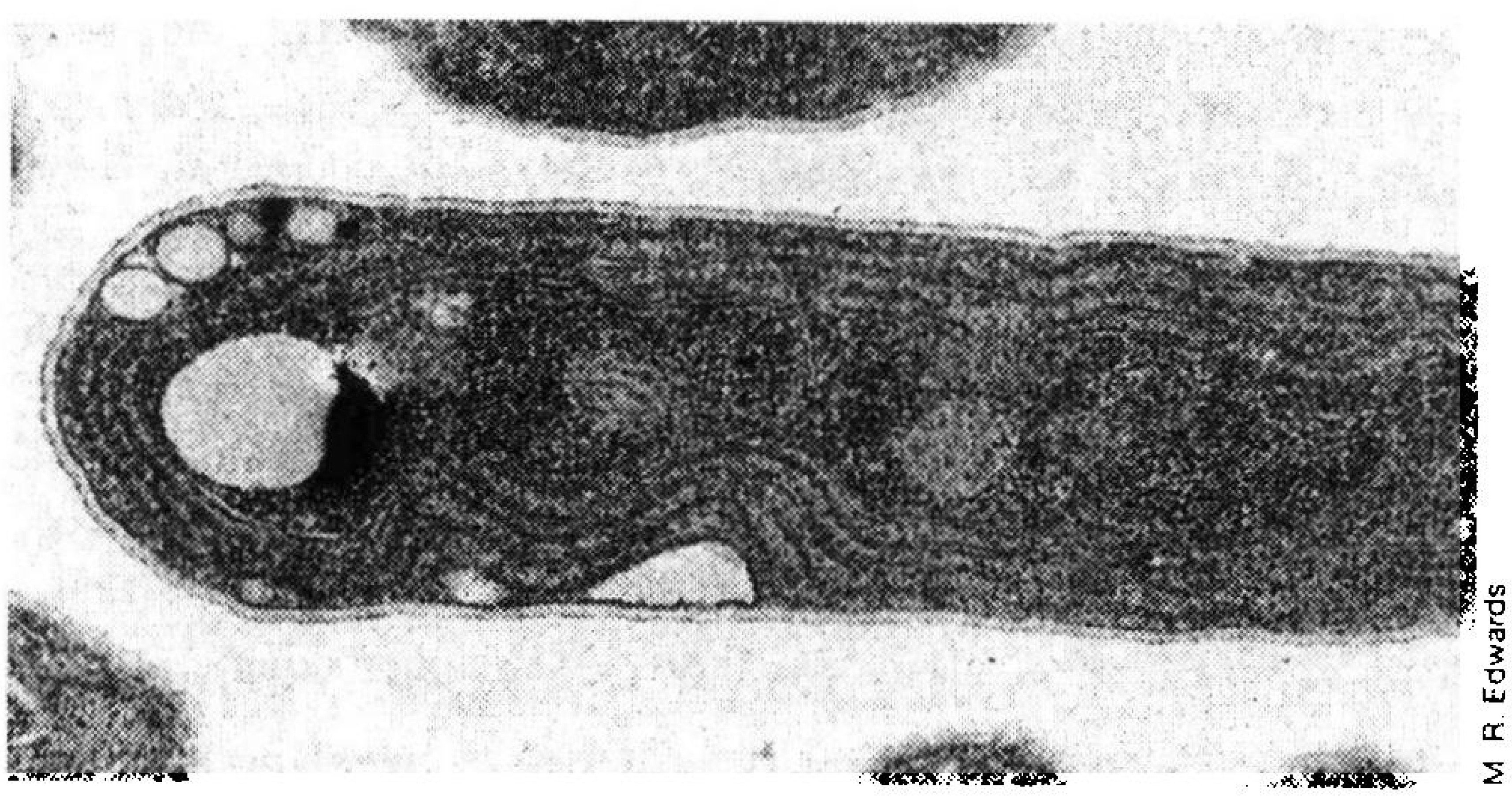


图 12.79 蓝细菌的类囊体。蓝细菌蓝色聚球蓝细菌（*Synechococcus lividus*）的超薄切片电子显微照片。细胞直径为 5μm。注意类囊体膜平行于细胞壁。

蓝细菌只有一种叶绿素，叶绿素 a（chlorophyll a），都有特有的藻胆蛋白色素，即藻胆素（phycobilin）（图 17.10a），作为光合作用的辅助色素。一种称为藻蓝素（phycocyanin）的藻胆素是蓝色的，与绿色的叶绿素 a 一起使细菌呈蓝绿色。然而，有些蓝细菌产生一种称为藻红素（phycoerythrin）的藻胆素是红色，产生这种色素的细菌通常

是红色或棕色的。

结构变化：气泡和异形囊胞

在许多蓝细菌的可见细胞质结构中有一种是气泡（gas vesicle），这种结构在野外水生生活亚种中很普遍（浮游类生物）。它们的功能是维持菌体的浮力，使菌体能停留在水中光密度最利于其光合作用的特定位置。一些丝状蓝细菌可形成圆的异形囊胞，看起来像空细胞，通常分布于丝状体周围或丝状体一端（图 12.80a）。异形囊胞（heterocyst）由营养体细胞异化而来，通常是异形囊胞蓝细菌中唯一的固氮位点（还原 N_2 成 NH_3，见 17.28 节）。在鱼腥蓝细菌，一种已深入研究的异形囊胞蓝细菌，在异形囊胞中发生复合基因重排产生连续的 *nif* 基因簇，该基因簇可作为一个单位表达（*nif* 基因编码固氮酶，见 17.28 节）。

异形囊胞与相邻的营养细胞存在胞间连接，与其进行物质交换。光合作用的产物从营养细胞进入异形囊胞，氮固定的产物从异形囊胞进入营养细胞（图 12.80b）。异形囊胞中藻胆素的含量很低，缺少有氧光合系统光合系统Ⅱ，无法由 H_2O 产生还原力（见 17.5 节）。没有光合系统Ⅱ的异形囊胞无法固定 CO_2，缺少还原 N_2 成 NH_3 必需的电子供体，被固定的碳从相连的营养体细胞转运异形囊胞，解决了这一问题（图 12.80b）。

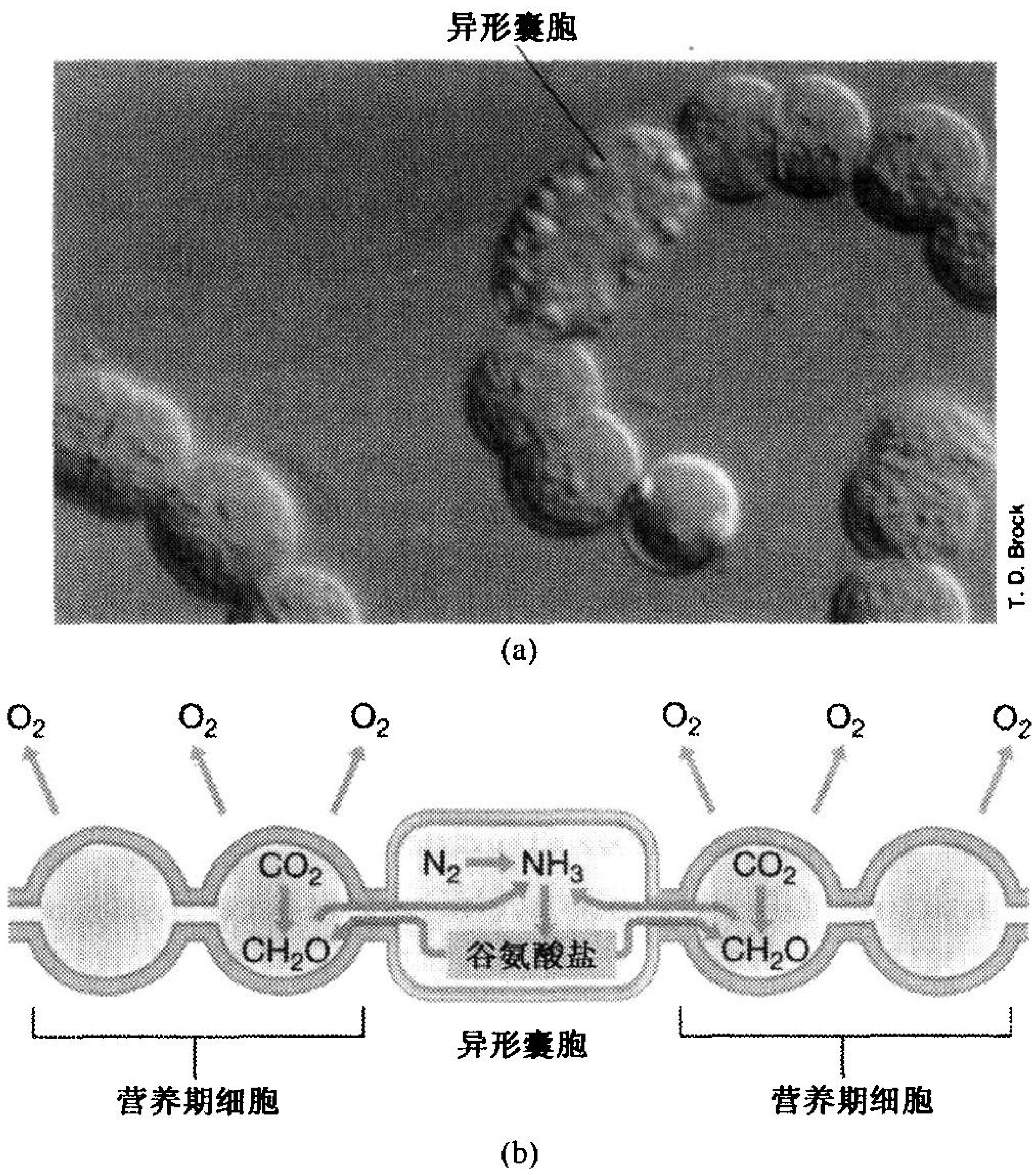


图 12.80　异形囊胞。(a) 鱼腥蓝细菌属（*Anabaena*）的异形囊胞。异形囊胞是此类蓝细菌固定氮的唯一地点。(b) 异形囊胞固氮的模式图。异形囊胞无法产生氧气，由邻近的营养细胞获得氮固定所需的还原物。氮固定的产物以谷氨酸的形式由异形囊胞运输到营养细胞。

异形囊胞外包裹一层加厚的细胞壁，该壁含有大量的糖脂，能减缓 O_2 向细胞扩散。由于固氮酶对 O_2 的不稳定性，异形囊胞中维持缺氧的环境，用以稳定需氧和产氧的固氮系统。事实上，有一些非异形囊胞丝状蓝细菌，当它们生长在缺氧环境中时，在营养体细胞中合成固氮酶进行氮固定。

蓝细菌藻青素及其他结构

在许多蓝细菌的电镜照片中可以看到一种叫做藻青素的结构。这种结构是天冬氨酸和精氨酸的共聚体：

$$\begin{array}{ccccccccccc} \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - & \text{Asp} & - \\ | & & | & & | & & | & & | & \\ \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & & \text{Arg} & \end{array}$$

构成细胞质量的10%。藻青素是一种氮储存物，当环境中氮匮乏时，多聚体分解，作为氮源。藻青素也是蓝细菌的能源储存体。源自藻青素的精氨酸能在精氨酸二氢水解酶的作用下水解成鸟氨酸，并释放ATP，氨甲酰磷酸作为反应中间体：

$$\text{精氨酸} + ADP + Pi + H_2O \longrightarrow \text{鸟氨酸} + 2NH_3 + CO_2 + ATP$$

许多蓝细菌中有精氨酸二氢水解酶，作为黑暗时的ATP来源。

许多蓝细菌能滑行运动，但并没有发现鞭毛。只有当细胞或丝状体附着在固体表面或其他细胞和丝状体时才能滑行。对于一些蓝细菌，滑行并不是简单的移动，同时还伴随旋转、反转和弯曲。大多数滑行菌种能向着光源移动（趋光性），可能具有趋化性。

在丝状蓝细菌中，丝状体常会形成连锁体（hormogonia）而发生断裂（图12.81a，b)。在一些菌种中，形成静息孢子或厚垣孢子（akinete）（图12.81c)，在黑暗、干燥或冰冻时保护菌体。它们都具有加厚的外壁，当外壁脱落时，它们开始发育，并长成新的营养菌丝体。然而，许多蓝细菌的营养细胞也能相对地抗干燥和低温。

蓝细菌的生理学

蓝细菌的营养要求比较简单。不需要维生素，能以硝酸盐或氨为氮源。固氮的菌种也很常见。大部分检测的菌种为专性光养生物，不能于黑暗处在有机化合物组成的培养基上生长。然而，有些种类的蓝细菌在光线存在时可利用一些简单的化合物如葡萄糖和醋酸盐。有些种，主要是丝状体蓝细菌可在黑暗中于葡萄糖或其他糖的培养基上生长。

有些蓝细菌的代谢产物有重要的现实意义。许多蓝细菌产生神经毒素，当大量的蓝细菌聚集在一起时，如果动物饮用了这样的水会很快致死。许多蓝细菌还能在新鲜的水体中产生土腥味，如果这样的水作为饮用水源将引起许多问题。导致土腥味的主要化合物是土臭味素（反式-1,10-二甲基-反式-9-萘烷酮）。许多放线菌也能产生这种物质并产生土壤所特有的气味。

生态学及进化

蓝细菌广泛分布于自然界的陆地、淡水及海洋中。总的来说，它们比其他藻类更能耐受不良环境，通常在热泉、盐水湖及其他恶劣环境中，蓝细菌是主要或唯一的光养生

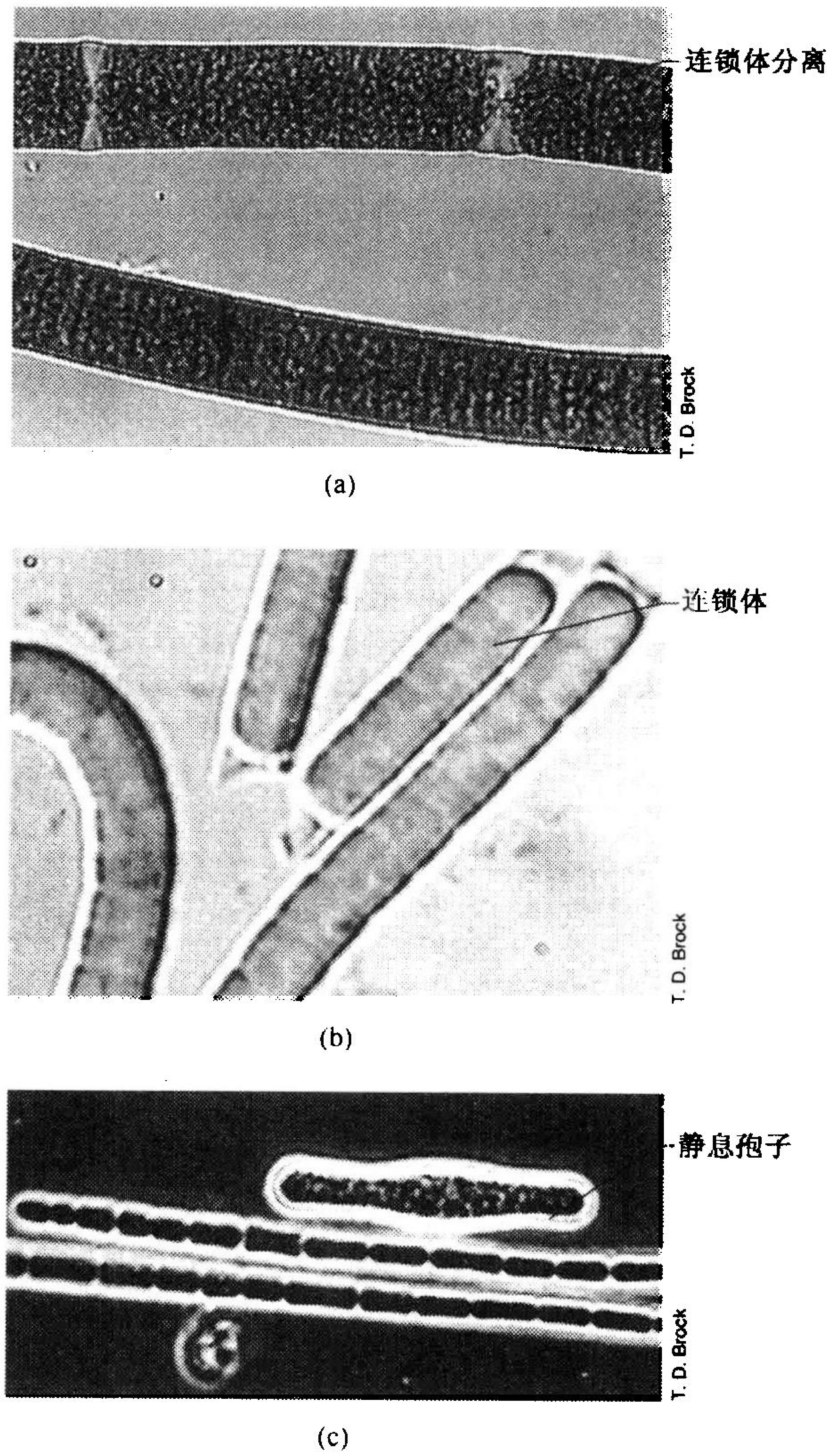


图 12.81　丝状蓝细菌的结构差异性。（a）颤蓝细菌属（*Oscillatoria*）中连锁体形成的初始阶段，注意连锁体与菌丝分离产生的空泡。（b）一种小的颤蓝细菌属亚种的连锁体，注意细胞两端都是圆的。（c）鱼腥蓝细菌属（*Anabaena*）的静息孢子（休眠孢子）的相差显微照片。

物（表 6.1），许多菌种也能生活在岩石或土壤的表面，甚至于岩石内部。在强烈阳光直晒的沙漠中，蓝细菌表面会形成硬壳，大部分时间维持休眠，只有在短暂的冬季和春雨时节才进行生长繁殖。在水温适宜的浅海湾，蓝细菌可能会形成厚厚的一层。在营养丰富的淡水湖，蓝细菌会大量繁殖形成水华（图 19.10b）。有少量蓝细菌是苔类、蕨类和苏铁类的共生物，而有一些则是地衣的光养成分。在水生蕨类满江红（*Azolla*）中（见 17.28 节和 19.22 节），蓝细菌作为其内生菌（鱼腥蓝细菌属的一种）所进行的固氮作用对这些植物本身必不可少。

蓝细菌基因组的碱基组成已被测定，单细胞种类的GC含量为35%～71%，如此广的范围表明，这类菌含有许多彼此之间亲缘关系很小的成员。另一方面，异形囊胞类的差别较小，GC含量为38%～46%。从系统发育角度看，蓝细菌大多遵循形态学界线。丝状异形囊胞和非异形囊胞种别形态明显不同，各属一枝。单细胞蓝细菌在进化上具有多样性，其代表种与许多不同类群之间有进化相关性。

12.26 原绿菌目和叶绿体

代表属：原绿球蓝细菌属（*Prochlorococcus*）、原绿蓝细菌属（*Proshloron*）、原绿丝菌属（*Prochlorothrix*）

原绿菌是含有叶绿素a、叶绿素b但不含藻胆素（phycobilins）的需氧光合生物。因此，它们既像蓝细菌（因为它们是原核生物且含叶绿素a），同时也与植物叶绿体相似（因为其含有叶绿素b，而不是藻胆素）。相比而言，原绿菌与蓝细菌的亲缘关系更近。

原绿蓝细菌属

原绿蓝细菌是最早被发现的原绿菌。它在自然界中是作为一种海洋无脊椎动物的共生物被发现的，还未能在实验室培养。原绿蓝细菌的细胞为粗球形，直径为8～10μm（图12.82）。

原绿蓝细菌的电镜照片（图12.82）表明，它有一层很厚的类囊体膜系统，与叶绿素的结构类似（图14.6）。由于原绿蓝细菌的细胞壁中含有胞壁酸，也就是说有肽聚糖存在，因此从系统发育上认为它是细菌的一员（见4.8节）。原绿蓝细菌的类胡萝卜素与蓝细菌的相似，主要是β-胡萝卜素和玉米黄素。从不同海鞘种类分离到的原绿蓝细菌样品GC百分比为31%～41%，表明了其遗传不均一性。因此，可能存在不同亚种的原绿蓝细菌，不过这要等到对纯化的菌株进行实验室培养和研究才能证实。

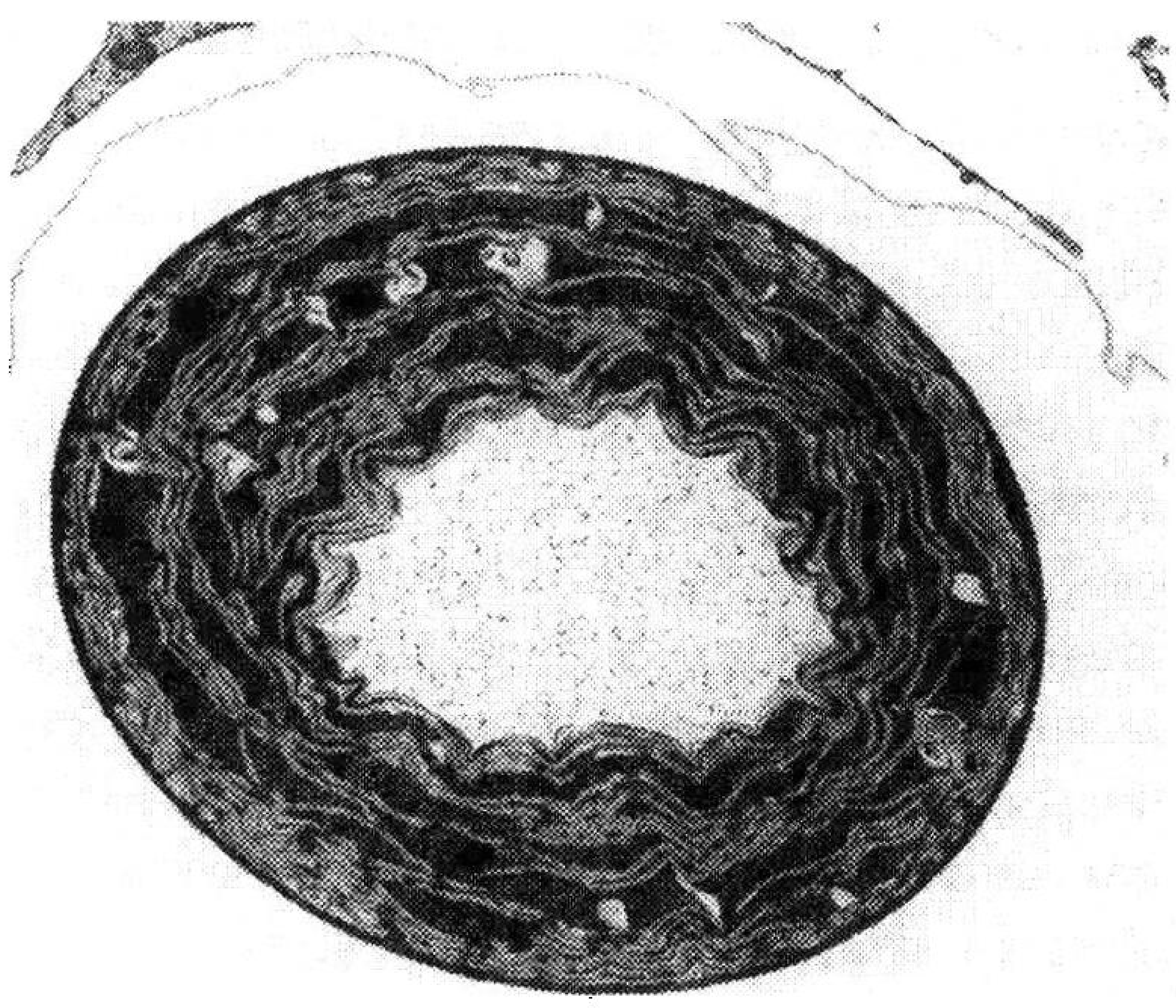


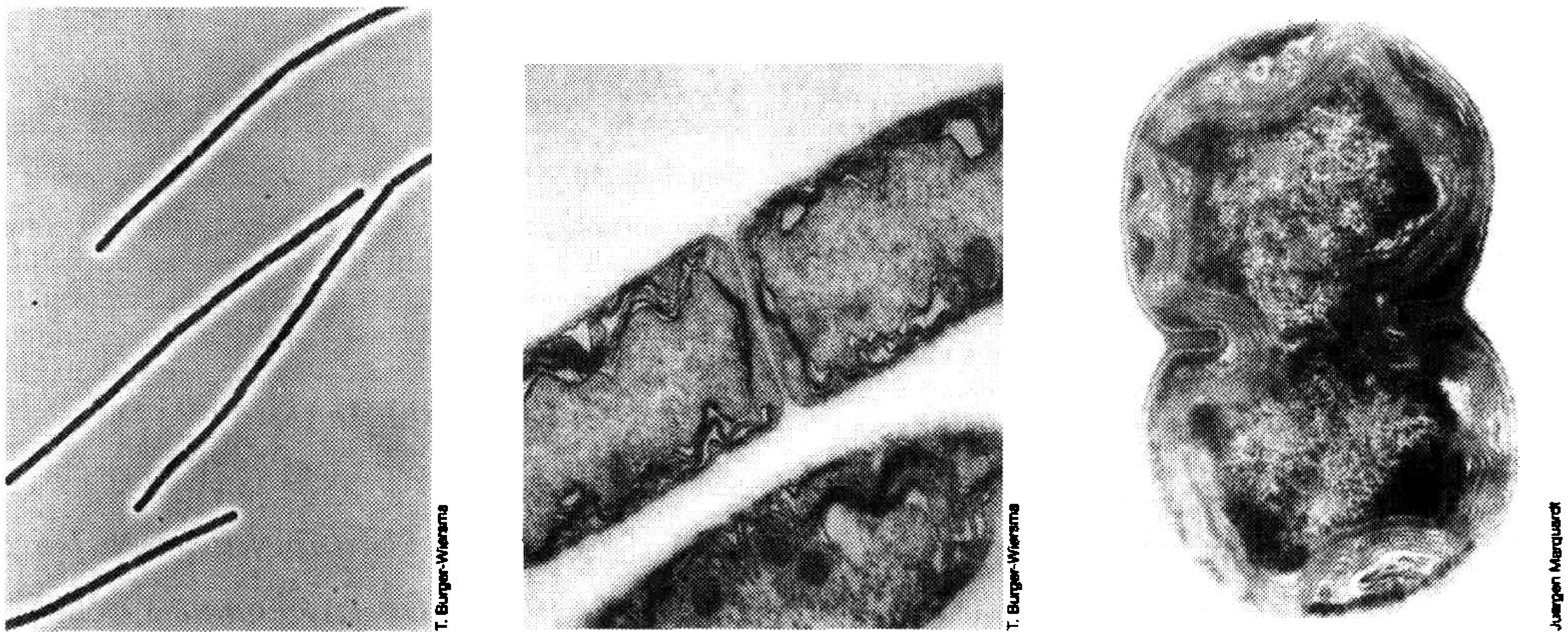
图12.82 原绿蓝细菌属的电子显微照片。注意其深入的胞质内膜（类囊体）。细胞直径为10μm。不同于蓝细菌，原绿菌缺少藻胆蛋白。

原绿丝菌和原绿球蓝细菌属

原绿丝菌是一种能进行纯培养的丝状原绿生物。像原绿蓝细菌一样，原绿丝菌含有叶绿素a和叶绿素b，缺少藻胆素，其类囊体膜远不如原绿蓝细菌发达。

在开放性的海洋深透光层发现了一种新的原绿生物。这种光合细菌是非常小的球菌，直径不到1μm（图19.11a），被命名为原绿球蓝细菌属。像其他原绿生物一样，原绿球蓝细菌属的细胞含有叶绿素b，缺少叶绿素a，取而代之的是一种叶绿素a的修饰物，二乙烯叶绿素a。原绿球蓝细菌含有一种在原核生物中未知的色素，

α-胡萝卜素（而非β型）。由于原绿生物，如原绿球蓝细菌在海洋中的数量相对较大（10^4～10^5个细胞/ml），因此它们作为开放性海洋中的主要成员可能有重要的生态学作用。也分离到了许多其他原绿生物，如 *Acaryochloris*（图 12.83c），其主要色素是叶绿素 d。许多藻类也含有叶绿素（真核细胞，见 14.13 节），其中有些种非常小（图 19.11c）。



(a)　　(b)　　(c)

图 12.83　丝状原绿蓝细菌原绿丝菌属和蓝藻的相差及电子显微照片。（a）相差。（b）超薄切片的电子显微照片显示的是膜的排列，细胞直径约 2μm。（c）蓝藻，这种原绿球蓝细菌含有叶绿素 d 为主要的叶绿素，细胞直径约 1.5μm。

原绿菌、叶绿体及其进化

根据我们对内共生的讨论（见 2.6 节、11.4 节和 14.4 节），原绿菌的进化意义就显而易见了。在发现原绿菌之前，人们一直认为叶绿体最初来源于蓝细菌与原始真核细胞的内共生作用。然而，至少有一个主要原因使得这种假设不被科学地接受：即如果目前所有的植物叶绿体进化色素成分最初来自于含有藻胆素的生物的内共生体，那么它是如何取代叶绿素 b 的呢？原绿蓝细菌取代了蓝细菌作为绿色植物叶绿体的祖先这一假设消除了这种疑惑。然而，系统发育分析没有表明原绿蓝细菌、原绿球蓝细菌和原绿丝菌是绿色植物叶绿体的直接祖先。而是原绿生物、蓝细菌和植物叶绿体都来自于一个共同的祖先。

另一假说无法解释原核生物有氧光合作用中的色素形成模式。蓝细菌和原绿生物可能由含有藻胆素和叶绿素（叶绿素 a 和叶绿素 b 或叶绿素 d）的祖先进化而来。由此，蓝细菌门进化中丢失了副叶绿素，而原绿生物丢失了藻胆素。今天我们在各类群中所发现的保留色素，代表了特定生境中光合色素的最佳组合。

概念检查

蓝细菌和原绿菌都是有氧光养原核生物。原绿菌和蓝细菌最大的区别是：原绿菌含有叶绿素 b 或叶绿素 d，缺少藻胆素。地球大气层中的氧气有可能起源于蓝细菌的光合

作用。

◆ 至少叙述3个蓝细菌与紫色细菌的不同点。
◆ 什么是异形囊胞，它有什么功能？
◆ 比较蓝细菌、原绿细菌和玉米的叶绿体的异同。
◆ 原绿球蓝细菌有什么生态学意义？

V 门5：衣原体

12.27 衣原体

代表属：衣原体属（*Chlamydia*）、嗜衣原体属（*Chlamydophila*）

衣原体属和嗜衣原体属不同于细菌，是专性寄生，并失去了更多的代谢功能（见12.1节）。一些关键种已被鉴定（表12.33）：鹦鹉热嗜衣原体（*Chlamydophila psittaci*）是鹦鹉热（psittacosis）的病原体；砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）是砂眼（trachoma）和许多其他人类疾病的病原体；肺炎衣原体（*Chlamydophila pneumoniae*）是许多呼吸系统综合征的病因（表12.33）。

表12.33 衣原体和热嗜衣原体不同种的特征

特 征	砂眼衣原体	鹦鹉热嗜衣原体	肺炎衣原体
宿主	人类	鸟类、低等哺乳动物、偶尔人类	人类
一般感染位点	黏膜	多位点	呼吸道黏膜
人与人之间的传播	普遍	很少	有可能
mol%GC	42～45	39～43	40
通过DNA：DNA杂交得到的与砂眼衣原体同源性%[a]	100	10	10
基因组DNA/kb（大肠杆菌＝4600）	1000	550	约1000
人类疾病	砂眼、中耳炎、非淋病双球菌性尿道炎（男性），尿道炎（女性）、性病性淋巴肉芽肿、子宫颈炎	鹦鹉热	呼吸系统综合征
家畜疾病	无	鸟类衣原体病（鹦鹉、长尾鹦鹉），肺炎，滑液组织关节炎，结膜炎（猫、羊、小牛、小猪、小马）	无

a. DNA与DNA杂交见11.11节。

鹦鹉热是一种鸟类传染病，偶尔会传染给人类引起类似肺炎的症状。砂眼是眼睛的慢性疾病，主要表现为角膜维管化并形成瘢痕，砂眼是引起人类失明的首要原因。砂眼衣原体的其他菌株会感染生殖泌尿道，衣原体感染是当前主要的性传染疾病之一（见 26.13 节）。表 12.33 对鹦鹉热嗜衣原体、砂眼衣原体和肺炎衣原体的特征和引起的疾病进行了比较。

分子和代谢性质

除了作为病原体外，衣原体的生物的、进化的和代谢的问题也引起了人们的极大兴趣。生化研究表明，衣原体具有革兰氏阴性的细胞壁，细胞中含有 DNA 和 RNA。被感染细胞超薄切片的电镜照片表明衣原体进行二分裂（图 12.84）。

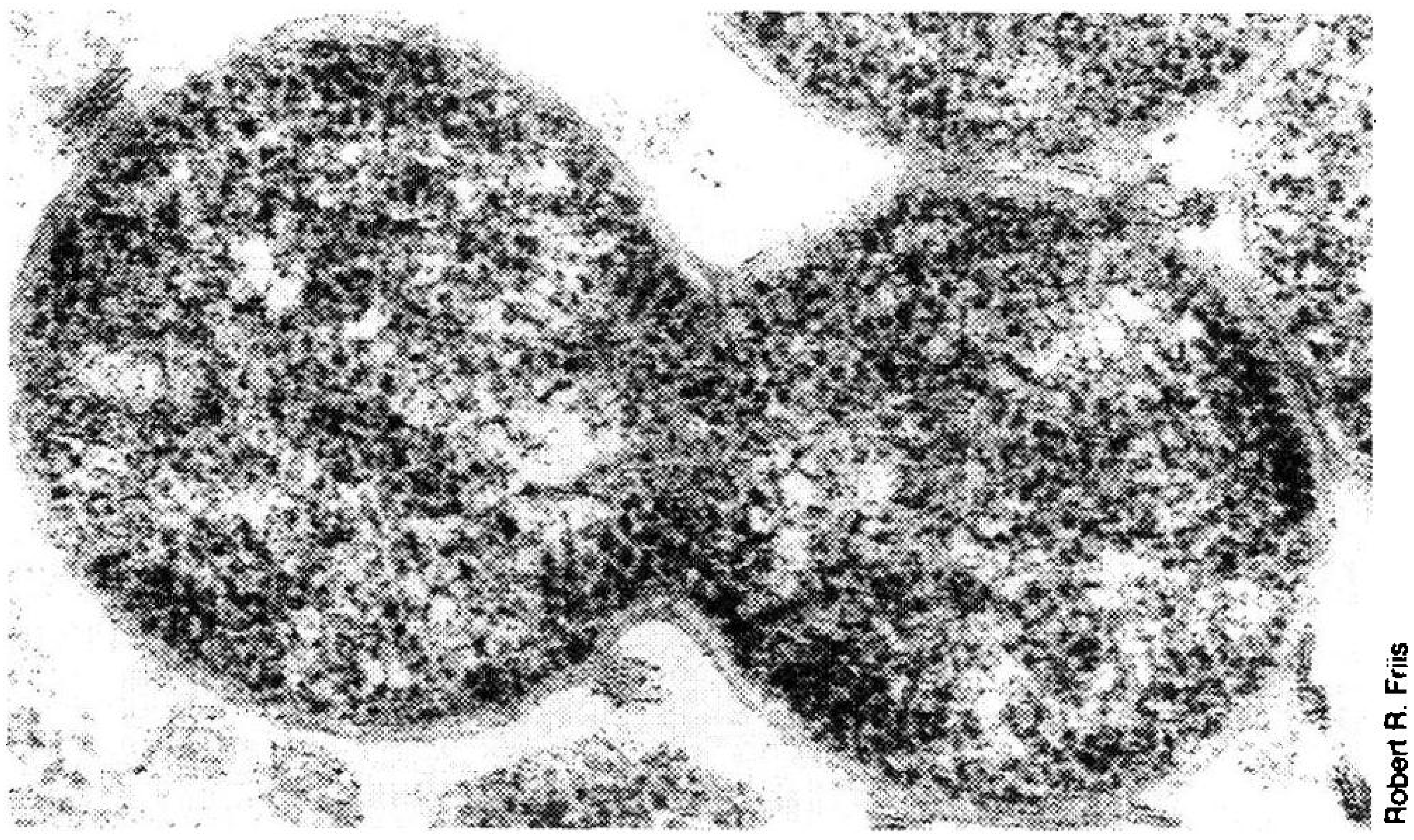


图 12.84　衣原体（Chlamydia）。在一个小鼠组织培养细胞中，鹦鹉热嗜衣原体的分裂细胞（网状体）的超薄切片电镜照片。单个衣原体细胞直径约 1μm。

衣原体的生物合成能力甚至比专性细菌胞内寄生的立克次氏体（rickettsia）还要受限制（见 12.13 节）。事实上，一度人们认为衣原体是“能量寄生”，像立克次氏体一样从宿主获得生物合成的物质和 ATP。然而，当砂眼衣原体全基因组被测序后，这种假说受到置疑（见 15.3 节）。几乎 1Mb 的砂眼衣原体基因组编码 ATP 合成基因，甚至还有肽聚糖合成的相关基因。这表明这种微生物很有可能含有肽聚糖，虽然细胞壁组分的化学分析并没有发现肽聚糖。然而，衣原体仍可能有细菌最简单的生化性质（表 12.34）。

表 12.34　专性胞内寄生立克次氏体与衣原体和病毒的比较

特征	立克次氏体	衣原体	病毒
结构			
核酸	RNA 和 DNA	RNA 和 DNA	RNA 或 DNA（单链或双链），两者不同时存在
核糖体	有	有	无
细胞壁	有肽聚糖	有肽聚糖[a]	无壁

续表

特征	立克次氏体	衣原体	病毒
结构			
复制期间结构完整性	保持	保持	不保持
代谢能力			
大分子合成	自身合成	自身合成	只能利用宿主细胞的结构合成
ATP 生成系统	有	有[a]	无
氧化谷氨酸的能力	有	无	无
对抗生素的敏感性	敏感	敏感（除青霉素）	抗性
系统发生	α变形细菌门	衣原体门	不是细胞

a. 一种衣原体砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）的基因组已被测序（见 15.4 节），有肽聚糖和 ATP 合成系统的基因。

有趣的是，砂眼衣原体基因组缺少编码 FtsZ 蛋白的基因，它是细胞分裂时隔膜形成的关键蛋白质（见 6.2 节）。以前认为，这种蛋白质对原核生物，包括古生菌和真细菌的生长是必不可少的。然而，在砂眼衣原体基因组中，有类似真核基因的排列方式，这表明它可能截取了一些宿主基因辅助其完成生命周期。

衣原体的生命周期

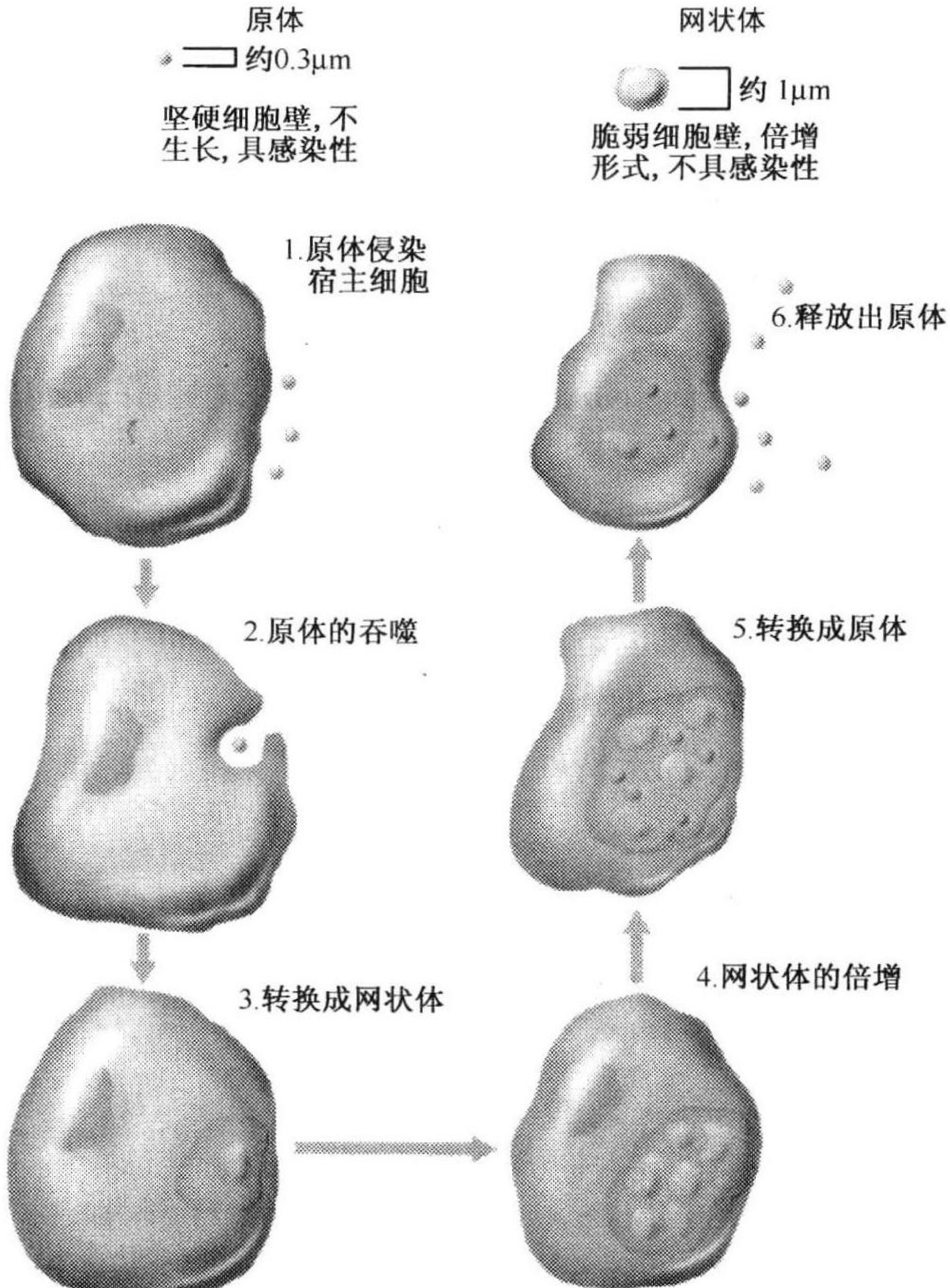
图 12.85 中列出了典型的衣原体的生命周期。在一个生命周期中有两种细胞类型：①一种是小的、致密的细胞，叫原体（elementary body)，这种细胞对干燥有相当强的抵御能力，是其进行扩散的主要形式；②另一种是较大、较疏松的细胞，叫网状体（reticula body)，这种细胞进行二分裂，是衣原体的营养体形式。

原体是非复制细胞，专门用于其感染性传播。而网状体是一种无感染性形式，专门负责在宿主中复制。不同于立克次氏体的是（见 12.13 节)，衣原体不通过节肢动物进行传播，而是主要通过呼吸道系统进行空气传播，这就是原体具有耐干燥能力的意义所在。图 12.84 是一个正在分裂的网状体。细胞经多次分裂之后，营养体细胞会转化为原体，在宿主裂解之后释放出去感染其他细胞。衣原体的世代周期一般为 2～3h，明显快于立克次氏体。

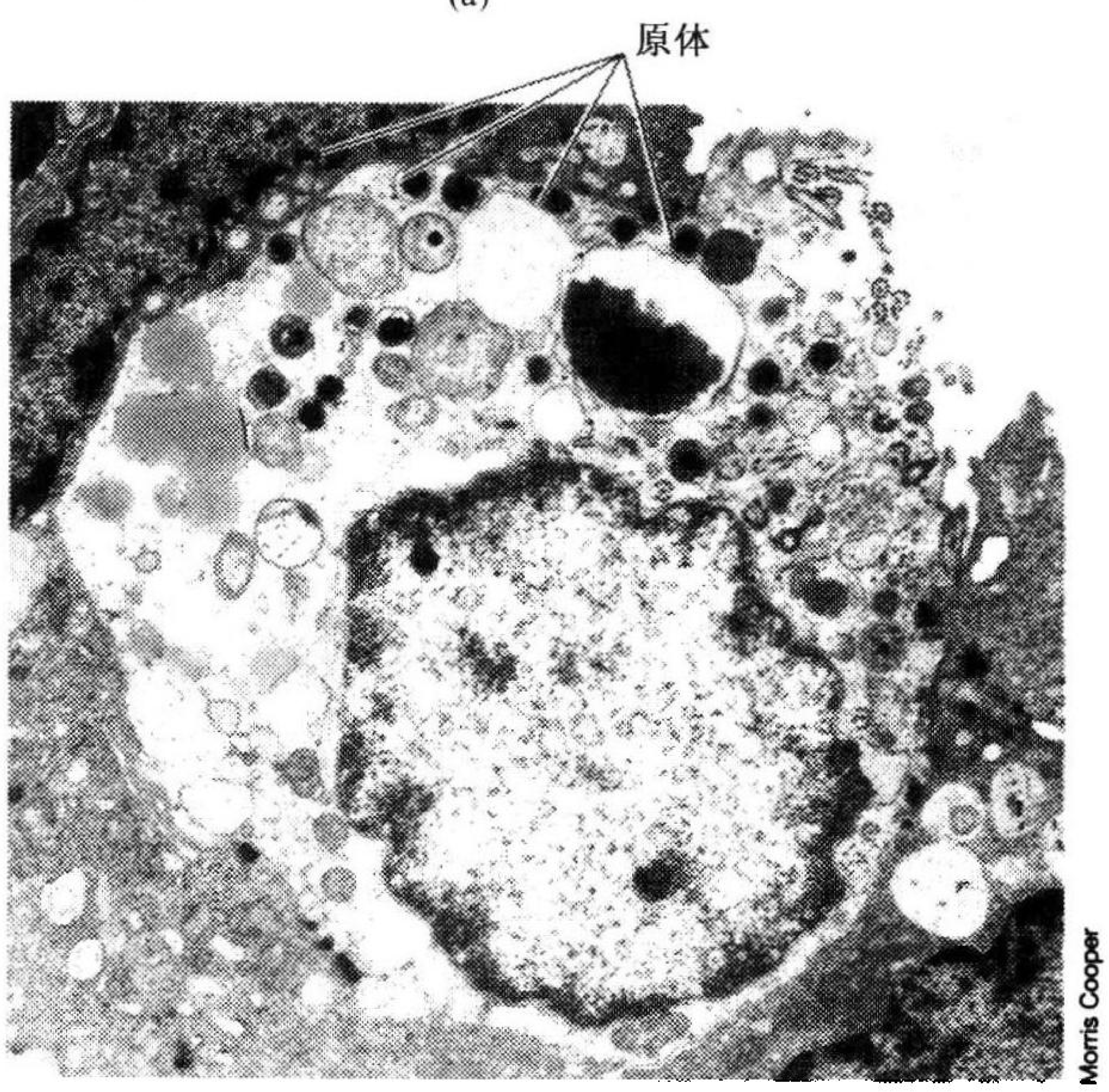
概念检查

衣原体是极小的寄生细菌，能导致一系列人类疾病。衣原体基因组很小，明显缺少很多代谢功能。

- ◆ 以表 12.34 为参考，如何区分衣原体和立克次氏体、病毒？
- ◆ 原粒体和网状体有何区别？
- ◆ 衣原体基因组测序有什么惊人的发现？



(a)



(b)

图 12.85　衣原体的感染循环图解。（a）循环图解：整个周期大约需要 48h。（b）人类衣原体感染，一个被感染的输卵管细胞正在裂解，释放出成熟的原体。

Ⅵ 门 6：浮霉状菌/小小梨形菌

12.28 浮霉状菌：进化上唯一的具柄细菌

代表属：浮霉状菌属（*Planctomyces*）、小小梨形菌属（*Pirellula*）、出芽菌属（*Gemmata*）

这一门的细菌包括许多形态一致的属，浮霉状菌属、小小梨形菌属、出芽菌属和等球菌属（*Isosphaera*）。研究最深入的是浮霉状菌属（图 12.86）。12.16 节中我们讨论了具柄细菌柄杆菌属。浮霉状菌属也是具柄细菌。然而，不同于柄杆菌属，浮霉状菌的柄由蛋白质组成，不含有细胞壁和细胞质（对比图 12.86 和图 12.41）。浮霉状菌的柄可能有附着功能，但是它更窄，优于柄杆菌。

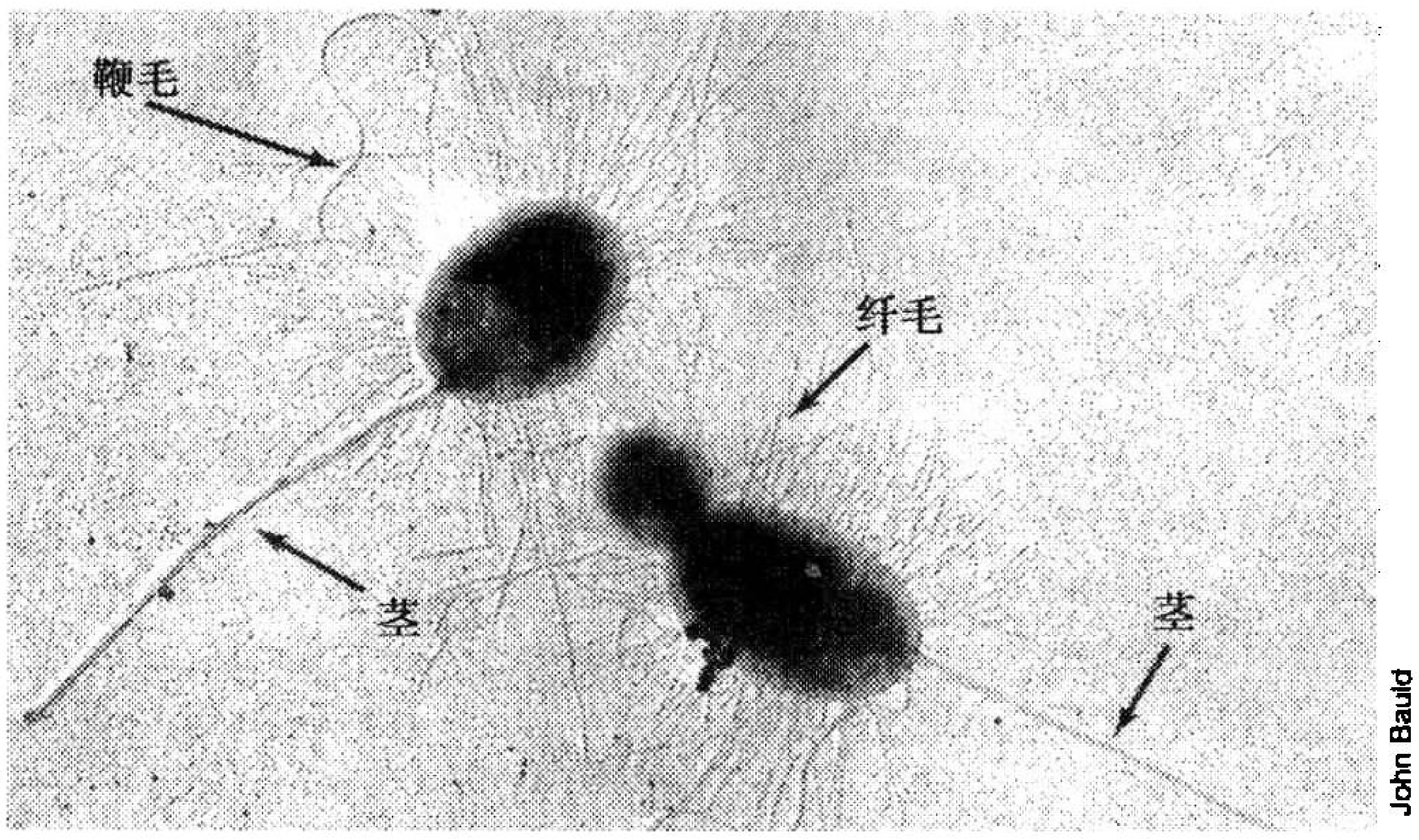


图 12.86 海洋浮霉状菌（*Planctomyces maris*）的金属蚀刻电镜照片。细胞 1～1.5μm 长。注意柄呈纤丝状，有许多菌毛，每个细胞都有鞭毛，在没有柄的一端出芽。

浮霉状菌属的其他特征

浮霉状菌及其相关菌也引起了人们的兴趣，因为它们缺少肽聚糖，细胞壁有 S 层结构（见 4.8 节和 4.10 节），由大量半胱氨酸（像胱氨酸）和脯氨酸组成。缺少肽聚糖的微生物，它们对阻断肽聚糖合成的抗生素具有抗性，如青霉素和头胞霉素。

像柄杆菌一样（图 12.41），浮霉状菌也是一种出芽细菌，生命周期如下：游动细胞附着于一个表面，从接触处长出柄，在出芽的另一极长成一个新的菌体。这种子细胞长出鞭毛后从母体中脱离，再开始新一轮的循环。从系统发育上讲，浮霉状菌是典型的兼性好氧化能异养型。

浮霉状菌的生境主要是水域，包括淡水和海水，等球菌是丝状的游动温泉菌。像柄杆菌一样（见 12.16 节），浮霉状菌及其相关菌的分离需要稀释，这一类已知的所有菌株都缺少肽聚糖，加入青霉素更能选择性地富集菌体。

在第 2 章中，我们已经介绍了原核细胞和真核细胞结构的主要区别。尤其是，真核细胞有核膜包围的细胞核（见 2.2 节）。然而，浮霉状菌是已知原核生物中唯一明显区室化的原核生物，包括由膜围起的核结构。例如，出芽菌（图 12.87）的拟核由核被包裹，其基因组是共价闭合环状超螺旋的，明显的原核生物形式（见 7.3 节），但是它有真正的膜将拟核与细胞质分开（图 12.87）。另一个有趣的分区存在于厌氧氨氧化布罗卡德氏菌（*Brocadia anammoxidans*）的厌氧氨氧化体。这种细菌在厌氧氨氧化体中将氨厌氧氧化成为氮气（见 17.12 节）。

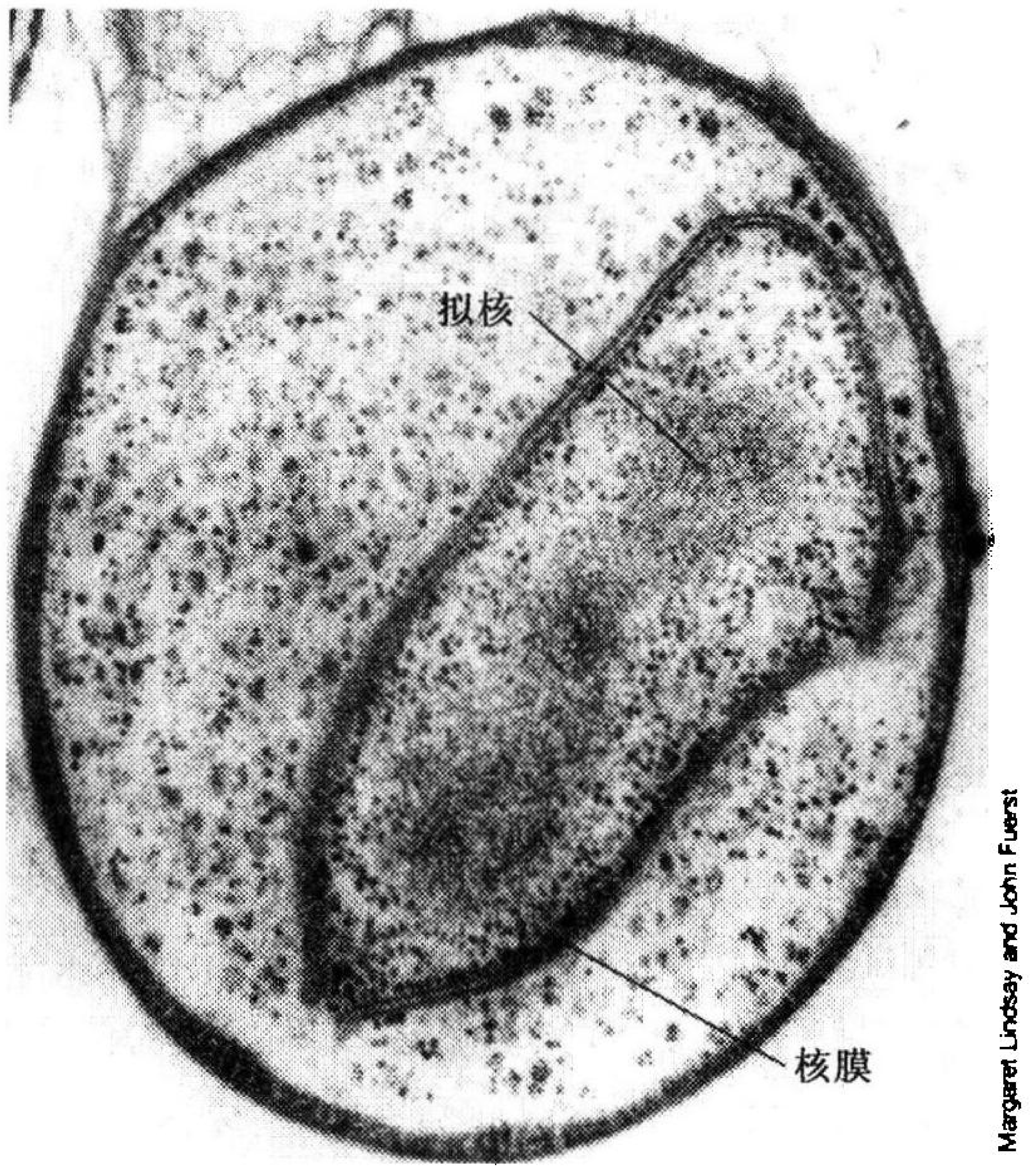


图 12.87　有核的原核生物。隐球出芽菌（*Gemmata obscuriglobus*）的超薄切片透射电镜照片，显示了拟核由一层核被包裹。细胞直径约 1.5μm。

目前，所有的浮霉状菌都含有一种或几种胞内特殊结构。一些结构缺少 DNA，因此可能具有其他功能（如代谢功能，见 17.12 节）。已知的原核生物中，浮霉状菌有最类似真核生物的胞内结构。事实上，浮霉状菌细胞的区室化模糊了原核生物和真核生物的结构区别。然而，浮霉状菌不只在细胞结构上是独特的，更特别的是它在细菌进化中处于核心地位（图 12.1）。

Ⅶ 门 7：疣微菌门

12.29 疣微菌属和突柄杆菌属

代表属：疣微菌属（*Verrucomicrobium*）

这一门的细菌与变形细菌门一样，有叫做辅肢（prostheca）的胞内结构形成。疣

微菌和柄杆菌每个菌体都有两个到几个辅肢（图 12.88）。而且，也不同于只有一个辅肢，产生有鞭毛但无辅肢游动子体的柄杆菌（图 12.41），疣微菌和突柄杆菌（*Prosthecobacter*）对称地分为两个，细胞分裂时母体和子体都有辅肢。属名 *Verrucomicrobium* 源于希腊文，意为“有疣的”，非常适于多刺疣微菌（*Verrucomicrobium spinosum*）表面多个辅肢的样子（图 12.88）。

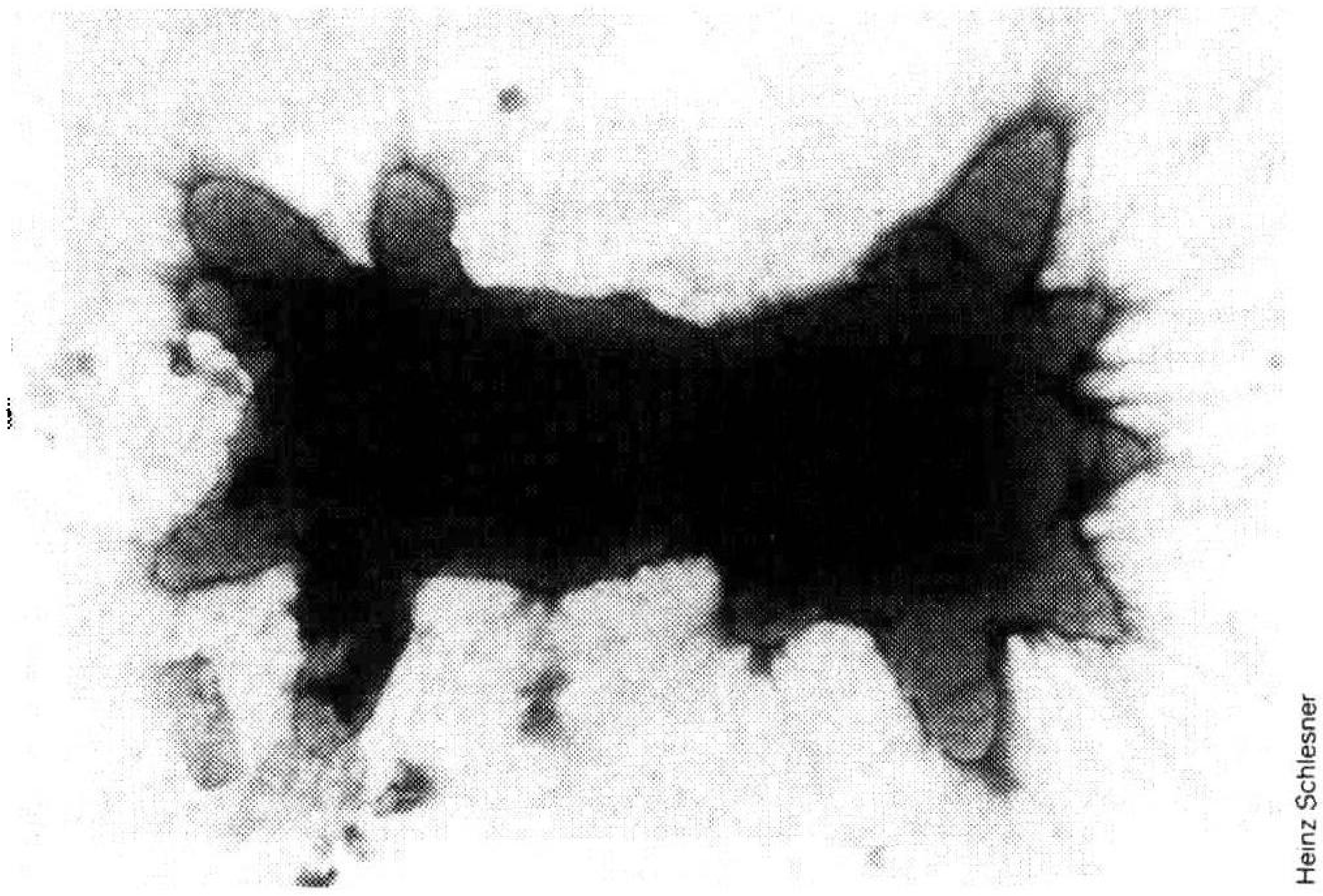


图 12.88 一个正在分裂的多刺疣微菌的负染透射电镜照片。 注意其疣状的辅肢。细胞直径约 1μm。

疣微菌门的细菌与其他有辅肢的菌一样，胞壁中含有肽聚糖，兼性好氧，能利用各种糖。疣微菌在自然界中分布极广，淡水、海水、森林和农用土壤中都存在。在系统发育上，疣微菌不同于已知的所有细菌（图 12.1）。这一门的细菌与浮霉状菌门和衣原体门在系统发育上有关联（图 12.1），但又与这两门有明显的不同。

已发现，突柄杆菌属的一些种有两个基因与真核细胞微管蛋白基因有极高的同源性。微管蛋白是真核细胞中构成细胞骨架的关键蛋白质（见 14.5 节）。虽然细胞分裂中的重要蛋白 FtsZ 也是微管蛋白家族，但突柄杆菌的蛋白质与微管蛋白的同源性比 FtsZ 更高。这些基因的存在可能表明，疣微菌门与真核生物有着特殊的关系，或者由同一祖先进化而来，或者在两者之间发生基因转移。

Ⅷ 门 8：黄杆菌门

黄杆菌门（Flavobacteria）的菌从专性好氧到专性厌氧，由一条系统发育线连成。这种微生物存在于各种不同的环境，我们主要介绍其中两个主要的属。

12.30 拟杆菌和黄杆菌属

代表属：拟杆菌属（*Bacteroides*）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）

拟杆菌专性厌氧，不产孢子，它们分解糖或蛋白质，根据不同底物，产物主要是乙酸或琥珀酸。大部分拟杆菌是共栖体，存在于人或其他动物肠道中（见 19.11 节和

21.4 节）。事实上，拟杆菌在人类大肠中在数量上是优势菌，每克人类粪便中有超过 10^{10} 个拟杆菌。然而，拟杆菌也是致病菌，与人类感染相关的最重要的厌氧菌。

拟杆菌在细菌中是不同寻常的，它是少数能合成鞘脂（sphingolipid）的菌种之一，鞘脂是一种脂类的异构集合，由长链的神经鞘氨醇取代了丙三醇（图 12.89）。像神经鞘磷脂、脑苷脂、神经节苷脂等鞘脂，在哺乳动物组织中很常见，尤其是在脑和其他神经组织中。

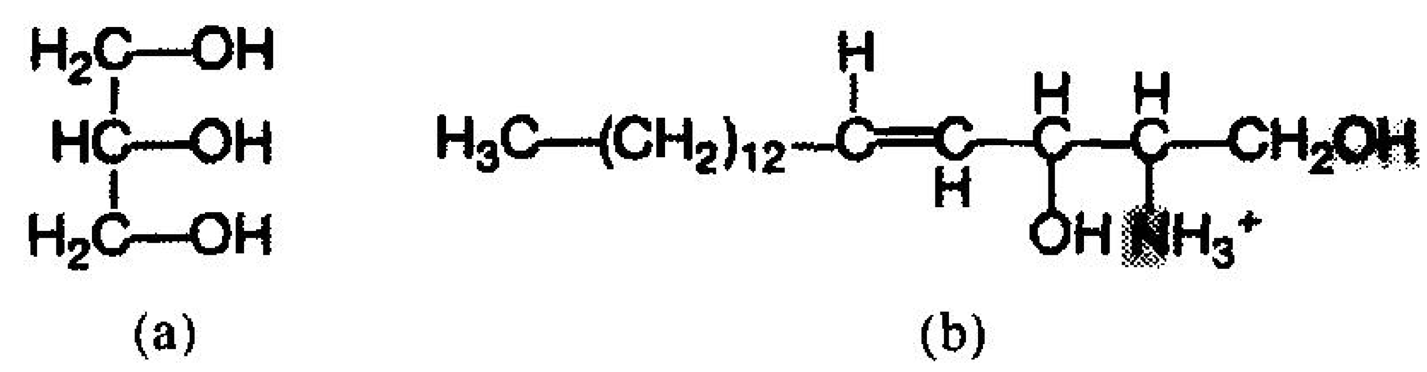


图 12.89　鞘脂。对比（a）丙三醇和（b）鞘氨醇。拟杆菌属（*Bacteroides*）所产的鞘脂的特征是酯化醇类；脂肪酸通过 N 原子（红色表示）以肽键连接，末端—OH（绿色表示）可被许多化合物取代，像磷脂酰胆碱（鞘磷脂）或各种糖（脑苷脂和神经节苷脂）。

相比拟杆菌，黄杆菌主要分布于水生环境中，包括淡水和海水，食品和用于食品加工的植物中也存在。大部分黄杆菌是黄色的，在生理上是好氧生物，以葡萄糖作为碳源和能源，极少能利用其他碳源。黄杆菌很少是致病菌；然而，脑膜脓毒性金黄杆菌（*F. meningosepticum*）与婴儿脑膜炎有关。

这一门的其他属是嗜冷菌或耐冷菌（见 6.11 节）。尤其是极杆菌属（*Polaribacter*）和冷弯菌属（*Psychroflexus*）。这一门的其他许多属也能在－20℃生长。

Ⅸ 门 9：噬纤维菌群

代表属：噬纤维菌属（*Cytophaga*）、屈挠杆菌属（*Flexibacter*）、红嗜热盐菌属（*Rhodothermus*）、盐水杆菌属（*Salinibacter*）

12.31 噬纤维菌属及其相关细菌

噬纤维菌群的有机体是细长的，革兰氏阴性杆状细菌，通常有尖的末端，滑行运动（图 12.90a，b）。相关的属生孢纤维菌属，在形态学和生理学方面与噬纤维菌属相似，但是，此属的细胞形成休止的球形结构，称之为小囊（microcyst）（图 12.90d），这些小囊与一些黏细菌目细菌产生的细胞相似（见 12.17 节）。噬纤维菌属和生孢纤维菌属广泛存在于土壤和水中，通常非常丰富。

许多噬纤维菌属细菌消化多糖，如纤维素（图 12.90c）、琼脂（图 12.90a）或者壳聚糖。在矿物盐琼脂表面放置几张纤维素滤纸，在滤纸上撒上土壤碎屑，这样可以很简单地分离到纤维素分解菌。黏附且消化纤维素滤纸的细菌形成散布的菌落（图 12.90c）。噬纤维菌属的菌不产生可溶性的胞外纤维素消化酶（纤维素酶）。相反，此类菌的纤维素酶仍然和细胞膜相连，这可能解释了为什么细胞必须与纤维素丝接触才能消化它们。

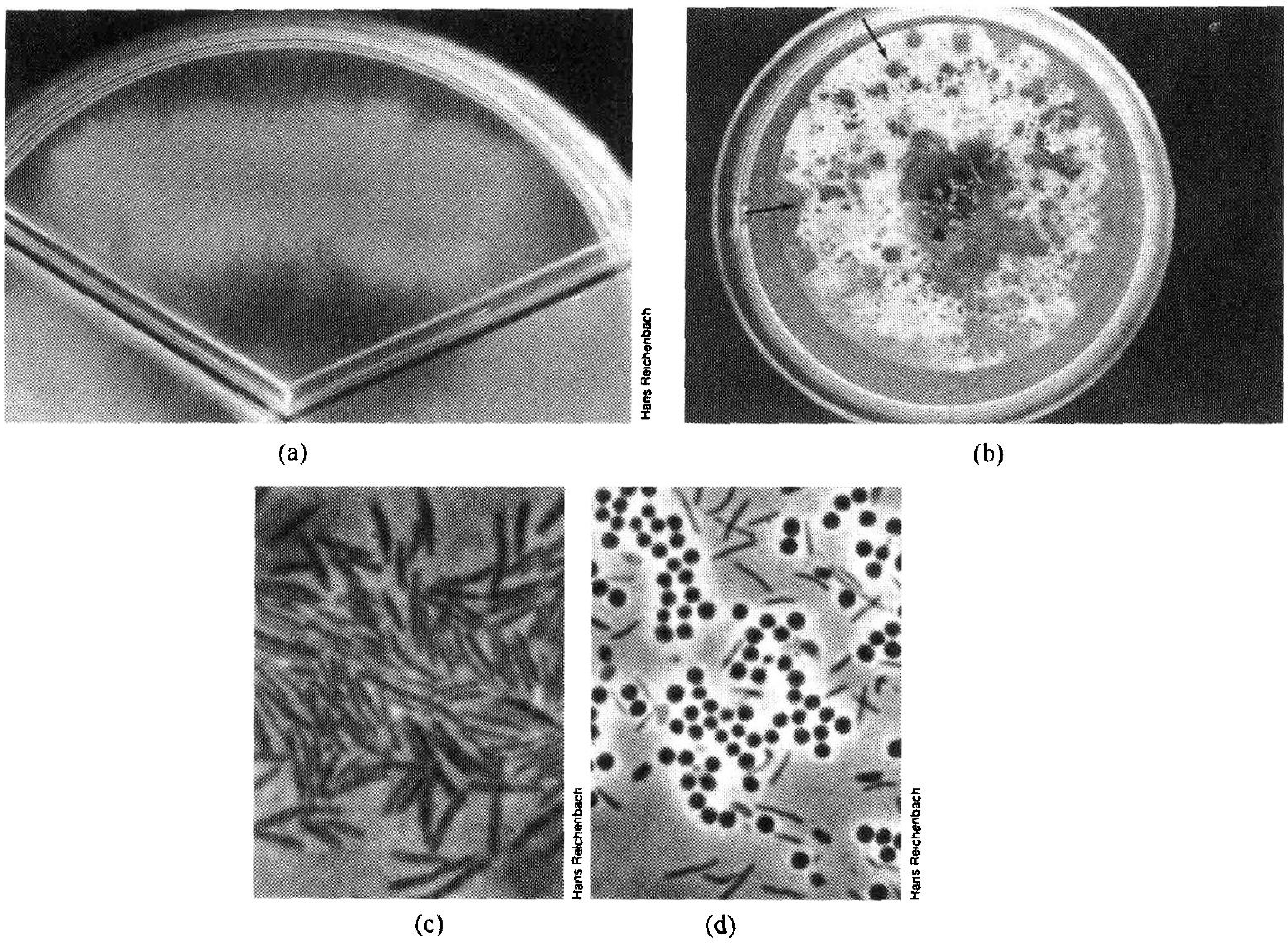


图 12.90 噬纤维菌属（*Cytophaga*）和生孢噬纤维菌属（*Sporocytophaga*）。（a）一个水解琼脂的海洋噬纤维菌属在 Petri 培养皿上水解琼脂形成的条状。（b）生长在纤维上的生孢噬纤维菌属形成的菌落。注意澄清的区域（箭头）纤维素已被水解。（c）哈氏噬纤维菌（*C. hutchinsonii*）生长在纤维素滤纸上的细胞相差显微照片（细胞的直径大约为 1.5μm）。（d）黏球生孢噬纤维菌（*Sporocytophaga myxococcoides*）的杆状细胞和球状包囊的相差显微照片（细胞和微包囊的直径分别为 0.5μm 和 1.5μm）。

在纯培养基中，噬纤维菌属可以在含有固定化纤维素膜的琼脂上生长，噬纤维菌的存在可以由纤维素降解产生的透明圈证明（图 12.90c 和图 17.62）。

噬纤维菌属和生孢纤维菌属是好氧菌，并且可能在自然界有氧环境中原核生物对纤维素降解中起主要作用。噬纤维菌属中许多菌也是鱼病原体，且能在渔业养殖中引起严重问题。两种最重要疾病，一种是柱形病（columnaris disease），由柱状噬纤维菌（*Cytophaga columnaris*）引起；另一种为冷水病（cold-water disease），由嗜冷噬纤维菌（*Cytophaga psychrophila*）引起。这两种疾病都倾向于感染受压力胁迫的鱼类，如生活在有污染排放物水域的鱼类，或者生活在高度限制环境如鱼类孵化所和水产业经营的鱼类。被感染的鱼类组织坏死，通常发生在腮的周围，这可能是因为从被感染的鱼类中分离到的噬纤维菌有特别强的蛋白质分解能力所致。

屈挠杆菌属不同于噬纤维菌属，屈挠杆菌属通常需要复杂的介质才能很好生长且它不能分解纤维素。一些屈挠杆菌属种类中的细胞可以由长的、滑行、缺少横壁（cross-wall）的细线状的细胞形态转变成短的，不移动的杆状菌。许多种类的菌由于细胞质膜上存在类胡萝卜素，或者称为屈曲红素（flexirubin）的相关色素于革兰氏阴性菌的外膜而有颜色。屈挠杆菌属是普通的土壤和淡水中的腐生物，没有种被鉴定为病原菌。

红嗜热盐菌属/盐水杆菌属

红嗜热盐菌属和噬盐细菌属于噬纤维菌门，但亲缘关系很远。红嗜热盐菌属和噬盐细菌属由革兰氏阴性，产红色或黄色色素，严格好氧化能营养型细菌组成。红嗜热盐菌属嗜热，最适生长温度为 60～65℃。红嗜热盐菌属在糖或者简单和复杂多糖中生长最好。此类菌生长在浅水域的海底温泉中，在陆地温泉中也发现了此类菌。红嗜热盐菌属产生热稳定的、有生物技术应用价值的水解酶，包括一种淀粉酶（可以降解淀粉）、一种纤维素酶（降解纤维素）、木聚糖酶（降解广泛存在于植物细胞壁中的半纤维素），还有其他很多酶。

噬盐细菌属是极度嗜盐的细菌，可能是所有细菌中最耐盐和需盐的细菌。实际上，它对盐的需求能与那些极度嗜盐的古生菌如嗜盐菌相媲美（见 13.3 节）。红色嗜盐菌是该属目前知道的唯一种类，生活在盐场结晶池和相关的高盐环境中。盐水杆菌属与盐杆菌属（*Halobacterium*）一样用 K^+ 作为相容性质，而此特性几乎在嗜盐生物的主要细菌中不存在（大多数喜盐细菌合成或者积累有机溶质来保持盐环境中的水平衡，见 6.14 节）。与有高度水解能力的红嗜热盐菌属相比，盐水杆菌属以氨基酸作为电子供体时生长最好，这与盐杆菌属相似。因此，尽管系统发生学上具有独特性，我们仍然认为盐杆菌属和盐水杆菌属是趋同进化的，在生理上它们采用相同的模式进化，这可能是因为这些有机体对极端环境的独特要求。

概念检查

浮霉状菌属包括杆状、出芽细菌，而黄杆菌属包括大量的革兰氏阴性菌，它们靠鞭毛活动或者在与动物、食物和土壤有关的介质中滑行。疣微菌门由于它们的柄杆细胞而区别于其他的细菌。噬纤维菌群包括大量的严格好氧的化能有机异养型细菌，这些细菌存在于土壤、水、温泉和热环境中。

◆ 浮霉状菌属的细胞壁和 DNA 的排列有什么独特性?
◆ 浮霉状菌属的杆状部位和柄细菌属的杆状部位有什么不同?
◆ 自然界中在哪里可以找到拟杆菌的大量成员?
◆ 描述一种从自然界中分离噬纤维菌属的一种方法。
◆ 比较红嗜热盐菌属和盐水杆菌属的生活环境和生理特征。

Ⅹ 门 10：绿硫细菌

12.32 绿菌属和其他绿硫细菌

代表属：绿菌属（*Chlorobium*）、绿棒菌属（*Chlorobaculum*）、突柄绿菌属（*Prosthecochloris*）、“染绿菌属”（*Chlorochromatium*）

绿硫细菌（green sulfur bacteria）是系统发生学上截然不同的群组，它们是不运动

的厌氧光合细菌，其培养分离物中只包括严格厌氧光合细菌。这组的细菌是受形态学限制的（morphologically restricted），且包括由短到长的杆状（表 12.35 和图 12.91）。像紫硫细菌一样，绿硫细菌利用 H_2S 作为电子供体，首先把其氧化成 S^0，然后再氧化成 SO_4^{2-}。但是与紫硫细菌不同的是，绿硫细菌产生的硫存在于细胞外（图 12.91a；图 17.17b）。大多数的种在有光时也可以同化一些有机复合物（即光能异养菌，见 17.4 节）。然而严格的自养型并不像紫硫细菌一样由卡尔文循环来提供能量，而是由三羧酸循环的一些逆向步骤代替（见 17.7 节，逆向三羧酸循环），这是自养型的一种独特方式。

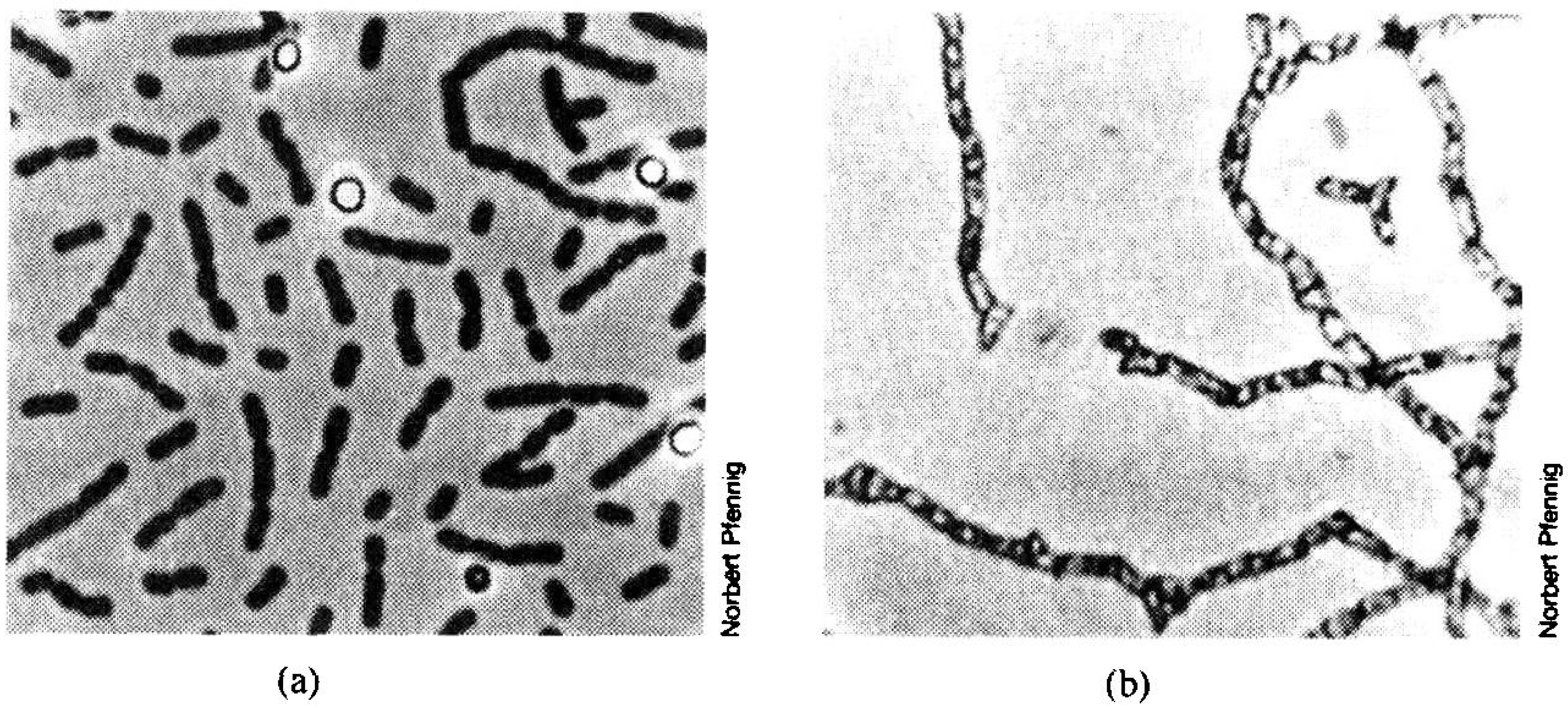


图 12.91　光养绿色硫细菌。（a）泥生绿菌（*Chlorobium limicola*），细胞大约 0.8μm 宽。注意沉淀在细胞外的硫颗粒。（b）格形暗网绿菌（*Chlorobium clathratiforme*），形成三维网状结构，细胞大约 0.8μm 宽。

表 12.35　光养绿色硫细菌的种属和特征

特　征	属/（mol%GC）
直的或弯曲杆状，一些形成分枝；不运动	绿菌属（*Chlorobium*）（49～58）
绿色或棕色，一些含有气囊	绿棒菌属（*Chlorobaculum*）（56～58）
球形和椭圆形，不运动，能形成附属物，绿色或棕色	突柄绿菌属（*Prosthecochloris*）（50～56）
杆状，滑动，绿色	绿滑菌属（*Chloroherpeton*）（47）

色素和生态学

在绿硫细菌中发现的细菌叶绿素包括细菌叶绿素 a 和细菌叶绿素 c、d 或 e。后者只在光捕获反应阶段起作用（见 17.2 节），存在于称为叶绿体的独特结构中（图 12.92）。叶绿体是长椭圆形、富含细菌叶绿素的结构，由薄的非结合的膜连接，并且在细胞边缘与细胞质膜结合（图 12.92 和图 17.7）。

对绿硫细菌中能量转移的研究（见 17.2 节）表明，由叶绿体中细菌叶绿素 c，d 或 e 吸收的光能集中到存在于细胞质膜的细菌叶绿素 a 处。在这里发生光合作用能量的转化和 ATP 的合成（图 17.7）。已知绿硫细菌有绿色和褐色两种，其中褐色的种类含有细菌叶绿素 e 和类胡萝卜素，这使得细胞呈现褐色（图 12.93 和图 17.9）。

像紫硫细菌一样（见 12.2 节），绿硫细菌生活在缺氧的水环境中，特别是 H_2S 丰

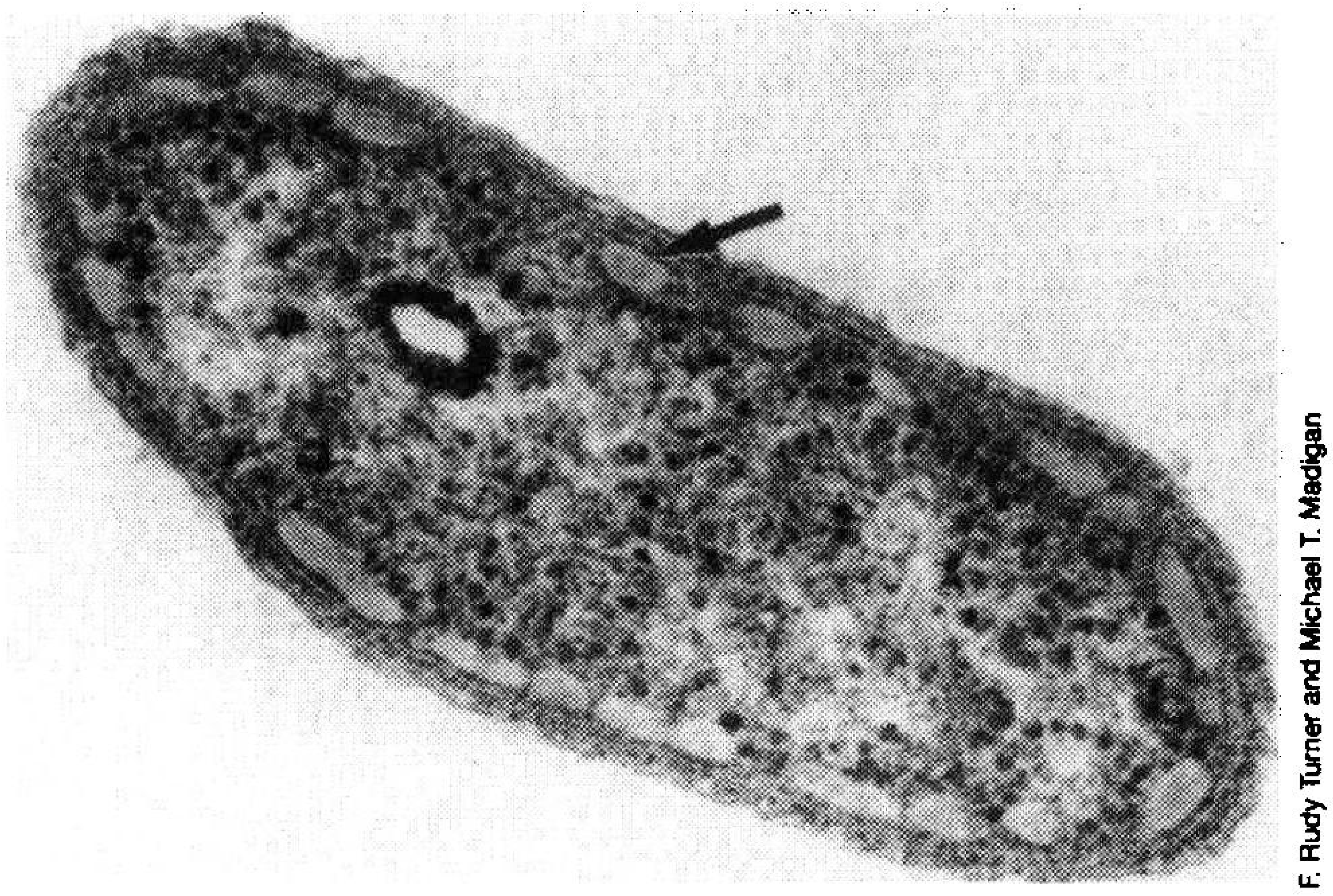


图 12.92　绿色硫细菌绿硫菌（*Chlorobium tepidum*）的薄片电子显微照片。注意细胞的外围是叶绿体（箭头），细胞大约 0.7μm 宽。

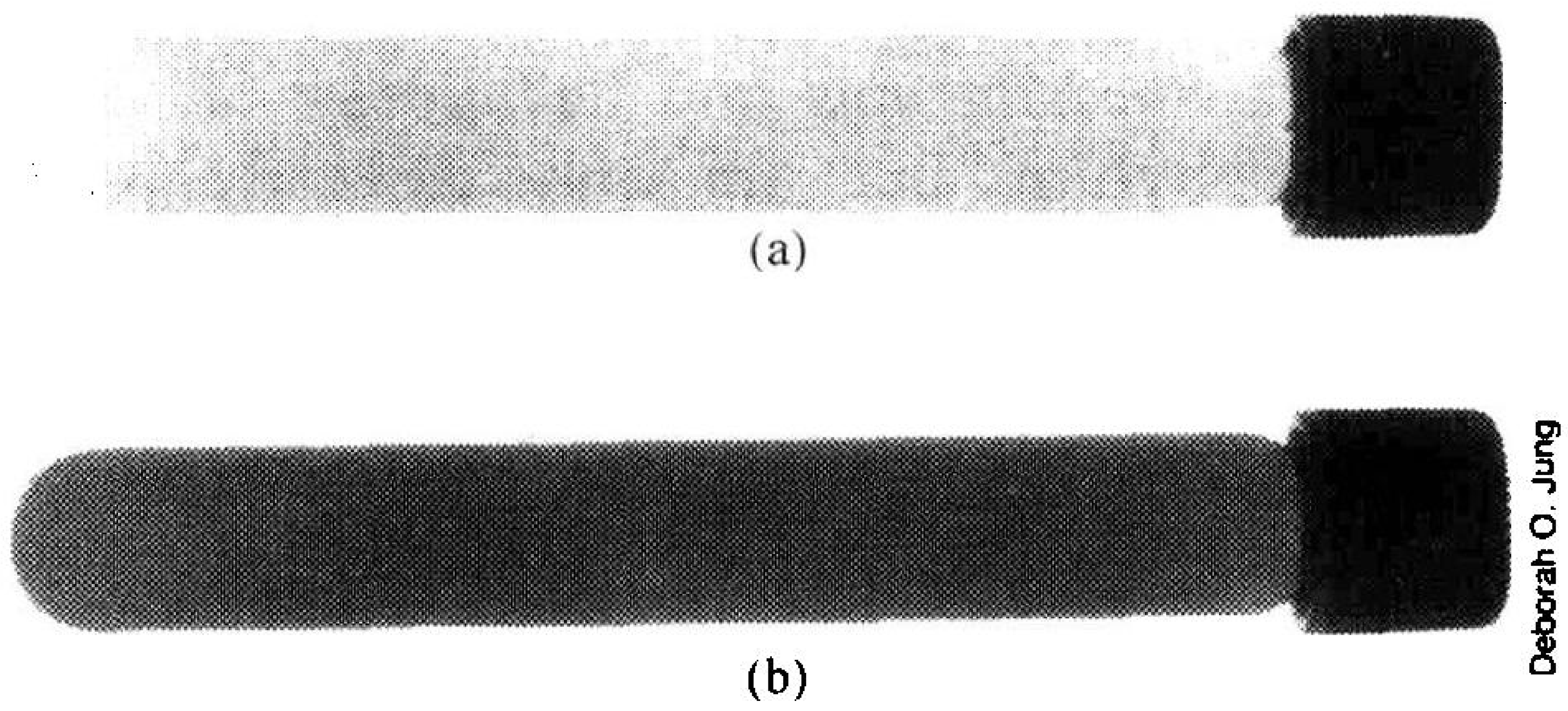


图 12.93　绿色和棕色绿菌纲。试管培养物（a）绿硫菌和（b）褐杆状绿菌（*Chlorobium phaeobacteroides*）。绿硫菌的细胞含有菌绿素 c 和一系列绿色的类胡萝卜素，而褐杆状绿菌含有菌绿素 e 和异胡萝卜素（isorenieratene），一种棕色的类胡萝卜素。特异的绿色和棕色胡萝卜素结构见图 17.9。

富的地方（一般来说，绿硫细菌比紫硫细菌更能耐受硫化物）。因为叶绿体是一种非常有效的光能捕获结构，所以只有很少的光就可以支持绿硫细菌的光合活性，因此它们通常存在于湖泊最深处的光能生物体中。

绿硫菌（图 12.92）是嗜热的，在高硫化物的热泉中形成密的微生物垫。绿硫菌由于其基因组（2.1Mb）已被全部测序而引人注目，这是所有厌氧光合细菌中第一个被测序的基因组。它生长的很快，并且能很好进行接合和转化的遗传操作，是研究绿硫细菌分子生物学的模式生物。

绿硫细菌聚合体

特定的绿硫细菌可以与一种称为聚合体（consortium）的有机化能细菌形成亲密的二膜联结。在这种聚合体中，每种生物体互利，因此在自然界中可能存在含有不同的光能和化能成分的多种聚合体。光能成分被称为附生生物（epibiont），与非光合部分物理

性地结合（图 12.94），尽管这种结合机制目前并不清楚。

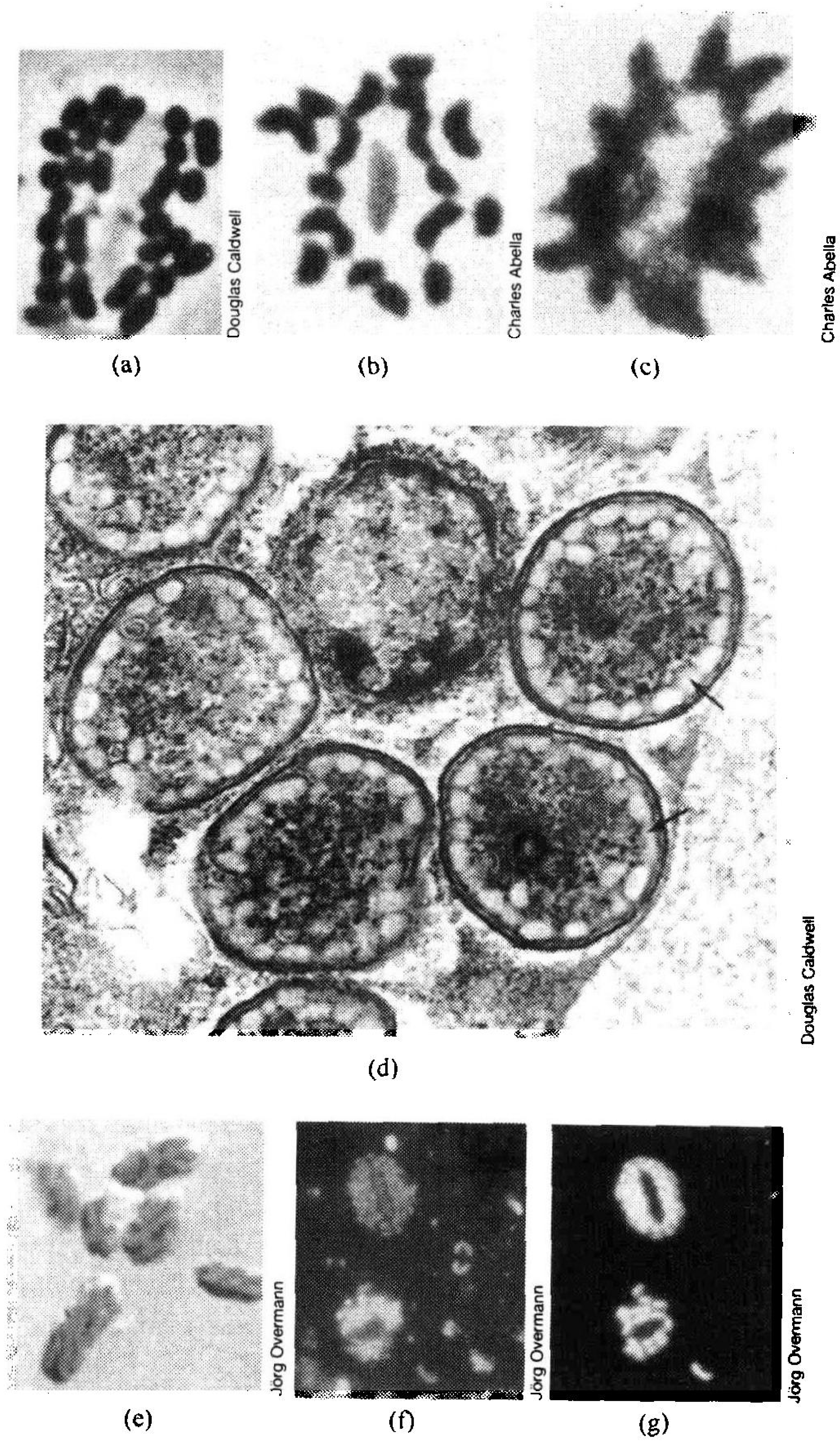


图 12.94 绿硫细菌团"聚生染绿菌"或"玫瑰暗色菌"。绿色或棕色细菌团的相差显微照片（a～c）和透射电子显微照片（d）。（a～c）中非光养中心有机体颜色光比色素光养细菌淡。注释，d 为叶绿体（箭头）。整个菌团直径大约 3μm。（e）聚生染绿菌细胞的不同的对比显微照片。（f、g）荧光显微照片，（f）DAPI 染色细胞（DNA 染色），（g）像（f）一样以进化探针对绿硫细菌（黄色）进行染色。

"聚生染绿菌"（*Chlorochromatium aggregatum*）用来描述一种被普遍观察到的聚合体，尽管这个名字在以前的分类学中并没有根据，这是因为它指的是两种分离的生物

体而不是一种。聚生染绿菌聚合体是绿色的，因为附生生物是含有细菌叶绿素 c 或 d 和绿色类胡萝卜素的绿硫细菌，且绿硫细菌包围在中心非光合细胞的周围（图 12.94e）。一种结构上相似的生物体被称为“玫瑰暗色菌”（*Pelochromatium roseum*）是褐色的。在另一种聚合体中，附生生物细胞是弧形的（图 12.94b，c）。

在实验室已经培养了一些绿细菌聚生体。平均来说，聚生染绿菌聚生体每个细胞大约含有 12 个附生生物，而玫瑰暗色菌大约含有 20 个。在附生生物的薄的部位看到的绿色体的再生（图 12.94d）及分子方面的证据证明了附生生物确实是绿硫细菌。用于绿硫细菌 16S rRNA（FISH 技术，见 11.7 节和 18.4 节）特异性配对的荧光寡核苷酸处理聚生体，发现是由附生生物而不是中心细胞产生荧光（图 12.94f，g）。对实验室培养物的研究表明，中心细胞和附生生物存在同步分化，这说明这两种成分有一些相互交换的方式。

目前还不清楚这些相互作用是如何形成的。但是，实验室和野外研究表明，聚生体中的附生生物适应了非常窄的光密度和硫化物浓度。因此中心细胞可能允许其他不运动的光合细菌在其细胞液中占据它的部位来进行光合作用。聚生体中的中心细胞可能从这种组织中获益，即吸收由光合作用形成的 CO_2 和进而由绿硫细菌分泌的营养。

概念检查

绿硫细菌是严格厌氧光合细菌，靠独特的被称为绿色体的结构来进行光合作用。这些有机体可在非常低的光密度下生长并且可以氧化 H_2S 成 S^0 和 SO_4^{2-}。聚生体含有光合绿细菌和一种非光合的中心细胞，在含硫的水环境是很普遍的。

◆ 绿色体中发现了什么样的色素？

◆ 绿硫细菌的自养型有什么独特性？（见 17.7 节）

◆ 有什么证据证明绿细菌聚生体中的附生生物就是绿硫细菌？

Ⅺ 门 11：螺旋体门

12.33 螺旋体

代表属：螺旋体属（*Spirochaeta*）、密螺旋体属（*Treponema*）、脊螺旋体属（*Cristispira*）、钩端螺旋体属（*Leptospira*）、疏螺旋体属（*Borrelia*）

螺旋体属是革兰氏阴性，可运动，紧密螺旋的细菌，形状上细长弯曲（图 12.95）。这些形态结构独特的原核生物形成了一种主要的细菌系统发育门（图 12.1）。螺旋体属广泛分布于水环境和动物中。一些可以导致疾病，包括一种重要的人类性传播疾病——梅毒（见 26.12 节）。

螺旋体细胞由原生质体柱（protoplasmic cylinder）组成，后者由细胞壁和原生质膜包围的区域构成（图 12.96）。这些菌体靠每一端的一到多个鞭毛运动（图 12.96）。然而，与典型的鞭毛细菌（见 4.14 节）不同，螺旋体的鞭毛从每一端向后折到原生质

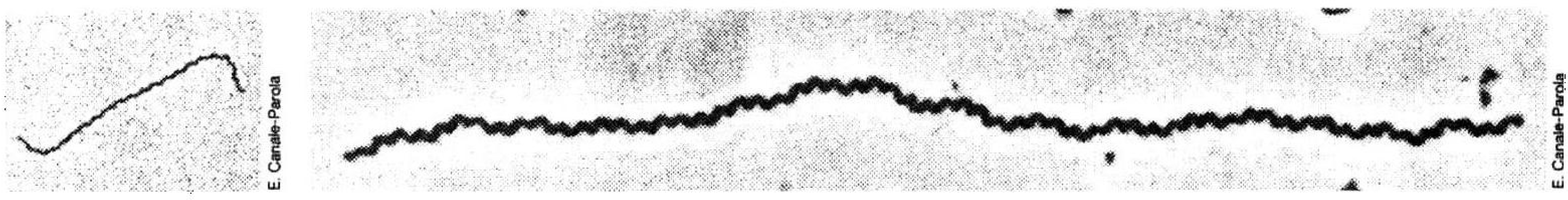


图 12.95 螺旋体的形态。相同的放大倍数，两种螺旋体显示这个菌群大小的范围较宽。(a) 紧卷螺旋体 (*Spirochaeta stenostrepta*) 相差显微照片，单细胞的直径为 0.25μm。(b) 折叠螺旋体 (*Spirochaeta plicatilis*)，单细胞直径为 0.75μm，长达 250μm。

体柱的上面，并且仍然定位在细胞的胞质中；因此，这些鞭毛也被称为内鞭毛 (endoflagella)，内鞭毛和原生质体柱被一种称为外鞘 (outersheath) 的多层但柔软的膜包围着 (图 12.96)。

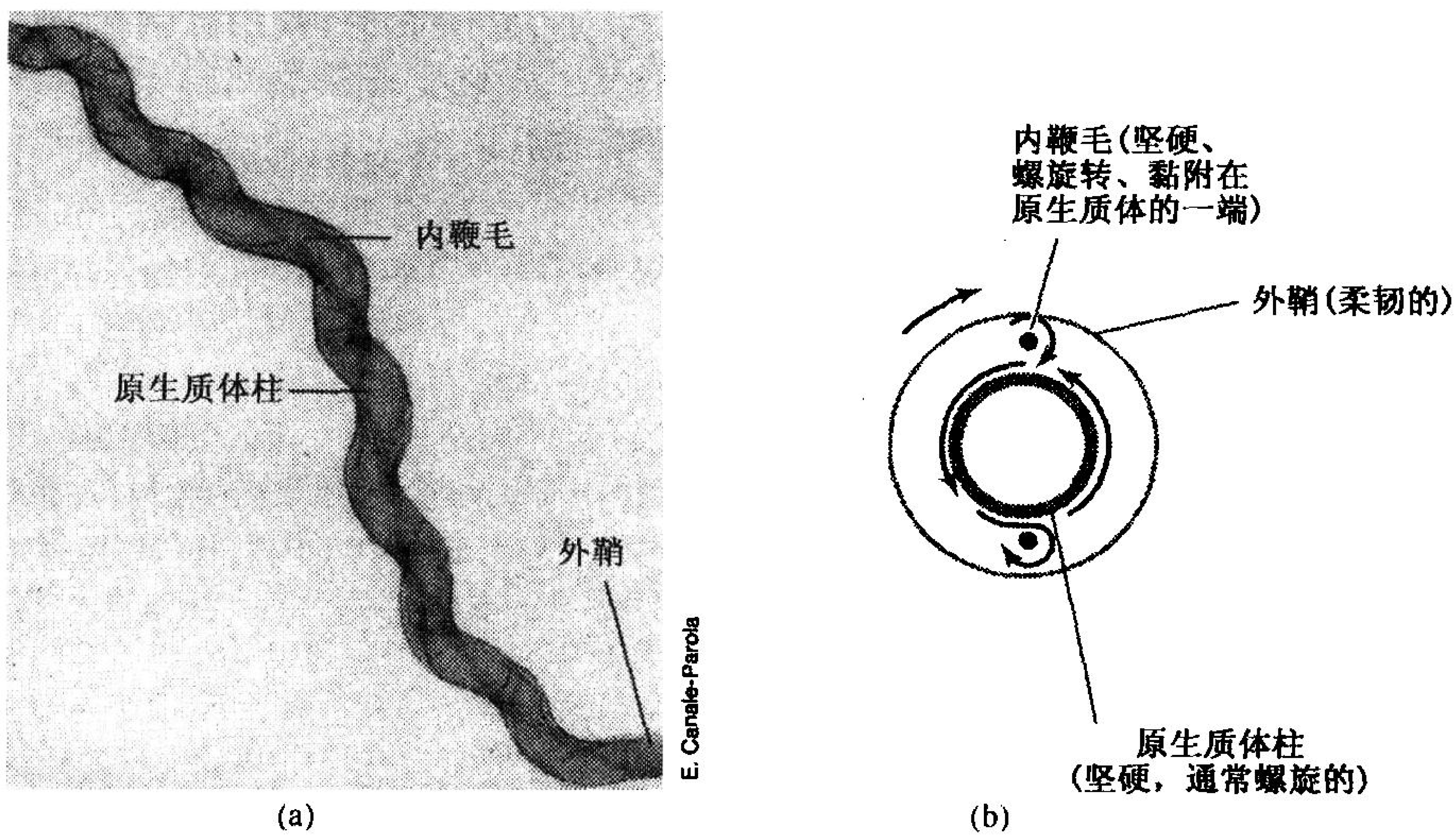


图 12.96 螺旋体的运动。(a) 朱氏螺旋体 (*Spirochaeta zuelzerae*) 负染色电子显微照片，显示内鞭毛的位置，单细胞直径为 0.3μm。(b) 螺旋体细胞的横截面，显示原生质体圆柱体内鞭毛和外壳的排列，以及内鞭毛旋转导致原生质体旋转和外壳旋转 (反向) 的形式。若外壳分离，细胞将围绕纵向的轴移动。若外壳与固体表面接触，细胞将爬行。

螺旋体的运动性

螺旋体有一种不寻常的运动模式。每个内鞭毛固定在细胞的一端，且大约为细胞长度的 2/3。内鞭毛像典型的细菌鞭毛一样旋转 (见 4.14 节)。然而，因为原生质体柱是刚性的，而外鞘是柔软的，所以当两个轴丝都向相同方向旋转时，原生质体柱向相反方向旋转，从而使细胞发生扭旋 (图 12.96b)。由于旋转的内鞭毛施加在原生质体柱上的力矩，而使得螺旋体细胞伸缩或者摆动 (图 12.96b)。因此，虽然内鞭毛并没有向细胞的外面延伸，但是鞭毛的旋转提供了细胞的运动性，尽管这是一种不同于其他原核生物鞭毛的一种不规则的模式。

分类

主要根据螺旋体的生境、致病性、系统发育、形态学和生理学特征而将其分为 8 个属。表 12.36 列出了主要的属及其特征。

表 12.36　螺旋体各属及其主要特征

属	直径/μm	特征	内鞭毛数目	DNA /(mol%GC)	生境	致病性
脊螺旋体属 (*Cristispira*)	(30～150)×(0.5～3.0)	3～10个完整的螺旋；相差显微镜下可见大量内鞭毛	>100	—	软体动物消化道；未被培养	不清楚
螺旋体属 (*Spirochaeta*)	(5～250)×(0.2～0.75)	厌氧或兼性好氧；致密或疏松螺旋	2～40	50～65	水生的，自由生活在淡水或海水	不清楚
密螺旋体属 (*Treponema*)	(5～15)×(0.1～0.4)	微需氧的或厌氧；螺旋或扁平螺旋范围大于0.5μm	2～32	25～53	共生或寄生在人体或其他动物中	梅毒，雅司病，猪痢疾，品他病
疏螺旋体属 (*Borrelia*)	(8～30)×(0.2～0.5)	微需氧的；5～7个大约1μm 的螺旋	7～20	46	人或其他哺乳动物，节肢动物	回归热，Lyme 氏疏螺旋体病，牛疏螺旋体病
钩端螺旋体属 (*Leptospira*)	(6～20)×0.1	好氧的，带有弯的或钩状的紧密螺旋；需要长链脂肪酸	2	33～43	自由生活或寄生于人体和其他哺乳动物	钩端螺旋体病
纤线菌属 (*Leptonema*)	(6～20)×0.1	好氧的；不需要长链脂肪酸厌氧菌	2	54	自由生活	不清楚
短螺旋菌属 (*Brachyspira*)	(7～10)×(0.35～0.45)	厌氧菌	8～28	25～27	温血动物的肠中	引起鸡和天鹅的腹泻
短小螺旋体属 (*Brevinema*)	(4～5)×(0.2～0.3)	微需氧菌，通过16S rRNA 测序在螺旋体门的进化树中形成深度分支	2	34～36	小鼠和鼩的血液和组织中	实验室小鼠的感染

螺旋体属和脊螺旋体属

螺旋体属包括自由生活的、厌氧的和兼性需氧的螺旋体。这些微生物非常普遍地存在于水、河流的泥浆、池塘、湖和海洋中。螺旋体属的一个种是折叠螺旋体（*Spirochaeta plicatilis*）（图 12.95b），它是在淡水和含有 H_2S 的海洋生境中发现的一种相当大的螺旋体。折叠螺旋体的轴丝排成一束且在卷曲的原生质体柱周围旋转。此菌的每一端都有 18～20 个内鞭毛。已经成功培养了另一个种紧卷螺旋体（*Spirochaeta stenostrepta*），如图 12.95a。它是严格厌氧的细菌，广泛存在于富含 H_2S 的黑色污泥中。它通过糖酵解途径把糖发酵成为乙醇、乙酸、乳酸、二氧化碳和氢气。橙黄螺旋体（*Spirochaeta aurantia*）是含有橙色素的兼性需氧菌，通过在无氧条件下的糖酵解途径

发酵糖，最终把糖主要氧化成二氧化碳和乙酸。

脊螺旋体属（*Cristispira*）（图 12.97）含有分布独特的生物体，这些生物体主要分布在特定软体动物的晶杆中，如蚌和牡蛎。晶杆是定位于结膜，可弯曲的半固体的杆状结构，因此，它常与食物中的小颗粒混合并联成网格。作为大的螺旋体，当脊膜螺旋体以拧螺丝的方式快速向前或向后旋转时，我们可以在晶杆中看到它们的微生物结构。脊螺旋体属可能存在于淡水和海洋软体动物中，但并不是所有的软体动物都有。遗憾的是，目前还没有成功地培养出此属的细菌。所以，现在还不清楚它们独特生境特性的生理学原理。

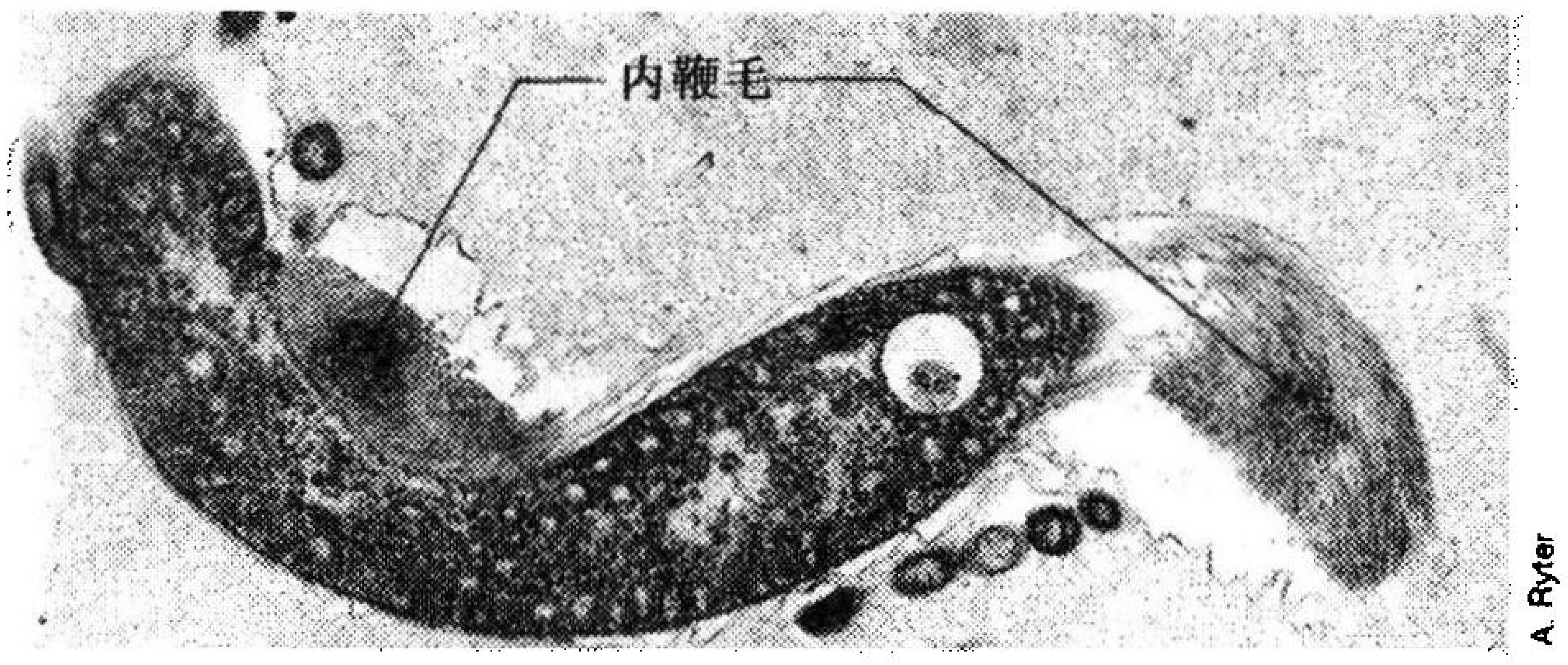


图 12.97 脊螺旋体属。脊螺旋体属（大的螺旋体）薄层电子显微照片，细胞的直径约 2μm，有许多内鞭毛。

密螺旋体属

密螺旋体属是厌氧、宿主相关的螺旋体属的细菌，与人类和动物共生或者寄生于人类和动物体中。苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）是引起梅毒的病原体（见 26.12 节），是目前了解最为清楚的密螺旋体菌。形态上，它与其他的螺旋体菌不同，其细胞不是螺旋的而是平波式的。苍白密螺旋体细胞相当薄，直径仅 0.2μm。因此，长期以来一直使用暗视野显微镜来检测可疑的梅毒病变患者病变处的渗出液（图 26.28）。

虽然可以用苍白密螺旋体人工感染兔和猴，但是在自然界中，苍白密螺旋体仅限于感染人类。尽管从来没有在实验室成功地培养出苍白密螺旋体，但是从对动物的研究中，我们发现有毒力的苍白密螺旋体细胞（从被感染的兔中分离到）含有细胞色素系统，并且是微好氧的。这类细胞能产生足够可以测序的苍白密螺旋体基因组 DNA（1.14Mb）（见 15.3 节）。

其他密螺旋体属的种在人类口腔中是普遍的共生菌，一般可在牙齿间残留物质和与牙龈和牙齿间的狭窄空间发现。齿垢密螺旋体（*Treponema denticola*）是主要的口腔螺旋体属菌，发酵氨基酸如半胱氨酸和丝氨酸，使之形成乙酸，乙酸是主要的发酵后的酸，发酵后也形成 CO_2、NH_3和 H_2S。

从白蚁的后肠中分离到了密螺旋体属代谢上不寻常的一个种。白蚁的后肠是高度分解纤维素的，因为白蚁主要生活在树上或者树木制品上。氢气和二氧化碳是纤维素产生的葡萄糖的发酵产物。*Treponema primitia* 把氢气和二氧化碳转化成乙酸，即同型产乙酸细菌（见 17.16 节讨论的同型产乙酸作用）。这种能量代谢方式是在梭菌纲及其亲缘种属以外的细菌系统发生群组里发现的第一个例子（见 12.20 节）。另外，后肠螺旋

体中的 *Treponema azotonutricium* 固定分子氮（见 17.28 节），以前并没有在螺旋体属中发现这种特性。

在瘤胃（反刍动物的消化器官）中也发现螺旋体（见 19.11 节）。嗜糖密螺旋体（*Treponema saccharophilum*）（图 12.98）是在牛的瘤胃中发现的，大的水解果胶的螺旋体。它严格厌氧，可以发酵果胶、淀粉、菊粉和其他植物多糖。这种菌及其他螺旋体可能在植物多糖向挥发性脂肪酸的转化中起重要作用，这对于反刍动物的碳源是有用的（见 19.11 节）。

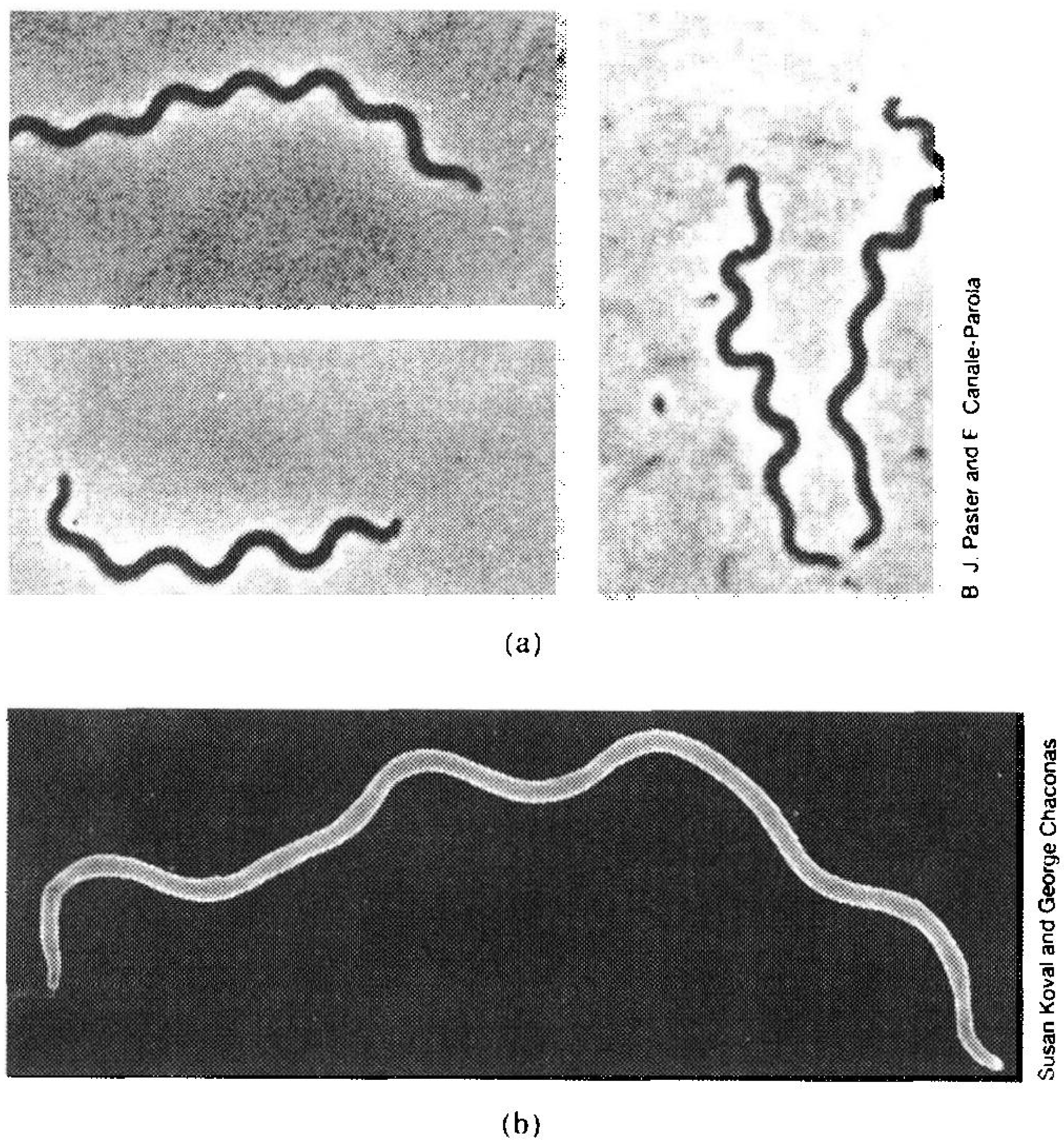


图 12.98　密螺旋体和疏螺旋体属。(a) 嗜糖密螺旋体相差显微照片，牛瘤胃中裂解胶质的螺旋体，细胞的直径约 0.4μm。左边常规螺旋细胞；右边不常规螺旋细胞。(b) 布氏疏螺旋体扫描电子显微照片，这种菌引起莱姆关节炎。

尽管螺旋体属在系统进化上是一个独立的分支，但是事实上苍白密螺旋体和其他的螺旋体种的亲缘关系较远。这是因为苍白密螺旋体的 GC 含量约为 53%，其他种的为 38%～40%，或者接近 25%。

疏螺旋体属

疏螺旋体属中的大多数种类是动物或人类的病原菌。回归热疏螺旋体（*Borrelia recurrentis*）是人类回归热疾病（relapsing fever）的致病菌。由昆虫作为载体传播，通常是人身体上的虱子。回归热的特征是高烧且伴随肌肉疼痛，持续 3～7d 后，反复发作为 7～9d。如果不治疗的话，高烧可能会再持续 2～3 个循环（因此称之为回归热）。被感染的人死亡率为 40%以上。所幸的是，这种菌对四环素非常敏感，如果能够正确诊

断此类疾病，那么治疗便很方便。其他疏螺旋体属在兽医学也很重要，因为它们可以引起牛、羊、马和鸟类的疾病。这些疾病大多通过蜱传播。

布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferii*）（图 12.98b）是蜱传疾病即莱姆病（lyme disease）的致病因子，感染人类和动物。27.4 节讨论了莱姆病。除此之外，布氏疏螺旋体有一定的价值，它是目前已知的少数含有线性染色体（以前认为因该菌是环状的）病原菌中的一种。布氏疏螺旋体属较小的基因组（1.44Mb）已被测序（见 15.3 节）。

钩端螺旋体属和纤线菌属

钩端螺旋体属和纤线菌属包括严格好氧螺旋体。这类菌用长链脂肪酸（如油酸）作为电子供体和碳源。除少数例外，这些长链脂肪酸是钩端螺旋体属生长的唯一底物。钩端螺旋体属细胞很薄，相当弯曲，并且经常在每一端弯曲成半环状的钩。目前，鉴定了几个种，一些是自由生活的，许多是寄生的。两种主要的种是问号钩端螺旋体（*Leptospira interrogans*）（寄生）和双曲钩端螺旋体（*Leptospira biflexa*）（自由生活）。问号钩端螺旋体寄生于人类和动物。啮齿类动物是大多数钩端螺旋体的自然宿主，尽管狗和猪也是特定菌株的携带者。

人类中最普遍的钩端螺旋体的综合征是钩端螺旋体性黄疸（leptospirosis），这是一种紊乱症，病菌寄生在肾脏并且引起肾衰竭和死亡。钩端螺旋体一般通过黏液膜或者皮肤上的裂口进入身体。它在身体的不同部位短暂繁殖后，便转移到肾脏和肝脏，导致肾炎和黄疸病，然后病菌通过尿排除体外。另一种最普遍的被感染方式就是与感染者的尿液接触。

用青霉素、链霉素或四环素治疗钩端螺旋体病是可能的，但是可能需要较长的疗程来减少肾脏的病菌。给驯养动物如狗使用联合的马蹄疫-螺旋体菌-肝炎灭活疫苗，发现狗对钩端螺旋体病产生了免疫。人类中，预防措施主要是通过切断动物传播疾病的途径防止感染。

概念检查

螺旋体属是紧密螺旋的、运动的、螺旋形的原核生物，包括自由生活的和寄生的病原菌。

- 螺旋体属的轴丝与大肠杆菌的鞭毛相比，在结构和功能上有什么特征？
- 说出两种由螺旋体属引起的人类疾病。
- 脊螺旋体属的生境习性是怎样的？
- 举出两例由螺旋体属引起的人类疾病。

Ⅻ 门 12：异常球菌

12.34 异常球菌属/栖热菌属

代表属：异常球菌属（*Deinococcus*）、栖热菌属（*Thermus*）

此门的细菌仅包括几个属，研究最为透彻的是异常球菌属和栖热菌属。后者包括嗜热有机化能异养型细菌，如水生栖热菌（*Thermus aquaticus*），从这株菌中得到了 *Taq* DNA 聚合酶。这种酶具有很强的热稳定性，是用于 PCR 反应的主要酶（见 7.9 节）。

此门的一些成员为革兰氏阴性菌，很少含有肽聚糖，在胞壁酸交联桥中鸟氨酸代替了二氨基庚二酸。异常球菌属和栖热菌属的大多成员均好氧生长，代谢糖类、氨基酸和有机酸，或者多种复杂的混合物。下面我们重点讨论异常球菌属。

异常球菌属包括革兰氏阳性球菌的 4 个种；其中对耐放射异常球菌（*Deinococcus radiopugnans*）研究的最清楚。它的细胞壁有复杂的结构，由包括外膜在内的几层组成（图 12.99），然而这种结构通常只存在于革兰氏阴性菌中（见 4.9 节）。与革兰氏阴性菌如大肠杆菌外膜不同的是，耐放射异常球菌的外膜缺少类脂 A。从土壤和灰尘中分离到了此菌。

耐放射异常球菌的抗辐射性

大多数的异常球菌属由于含有类胡萝卜素而呈现红色或者粉红色，许多菌株对紫外辐射和干燥有高度的抗性。对辐射的抗性可用于分离异常球菌属。把样品暴露于高强度的紫外辐射下（甚至 γ 射线）后，将其涂布于含有胰蛋白胨和酵母提取物的加富培养基中，从土壤、碎肉、灰尘和滤气中分离到了耐放射异常球菌。因为耐放射异常球菌的许多菌株比细菌内生孢子更为有抗性，那么用高强度的辐射处理样品可以有效地杀死样品中的其他生物而不是耐放射异常球菌，这使得异常球菌属的分离相对比较直接。例如，耐放射异常球菌的细胞可以在高于 15 000Gy 的离子辐射下（1Gy=100rad）存活。这能有效地把生物体的染色体断裂成成百的碎片（相比下，人类暴露于小于 10Gy 的辐射即可被杀死）。

耐放射异常球菌除了重要的抗辐射能力，也对许多其他的突变剂有抗突变效应。唯一对耐放射异常球菌有作用的化学突变剂是亚硝基胍，它倾向于诱发 DNA 的缺失。很明显地，在此菌中缺失并不能像定点突变一样被有效修复，用这种方法可以分离到耐放射异常球菌的突变体。

耐放射异常球菌的研究说明，其修复损伤 DNA 具有很高的效率，同时存在几个不同的 DNA 修复酶。除了 DNA 修复酶 Rec A（见 10.6 节），耐放射异常球菌中存在一些 Rec A 系统，能修复单链和双链 DNA 的突变，同时切除和修复错配碱基。事实上该菌的修复过程非常有效，甚至能够重新装配片段状态的染色体。

同时耐放射异常球菌细胞中独特的 DNA 排列可能与抗辐射有关。耐放射异常球菌细胞总是以 2 个或 4 个存在（图 12.99a）。为了像典型拟核一样在细胞中集中 DNA，耐

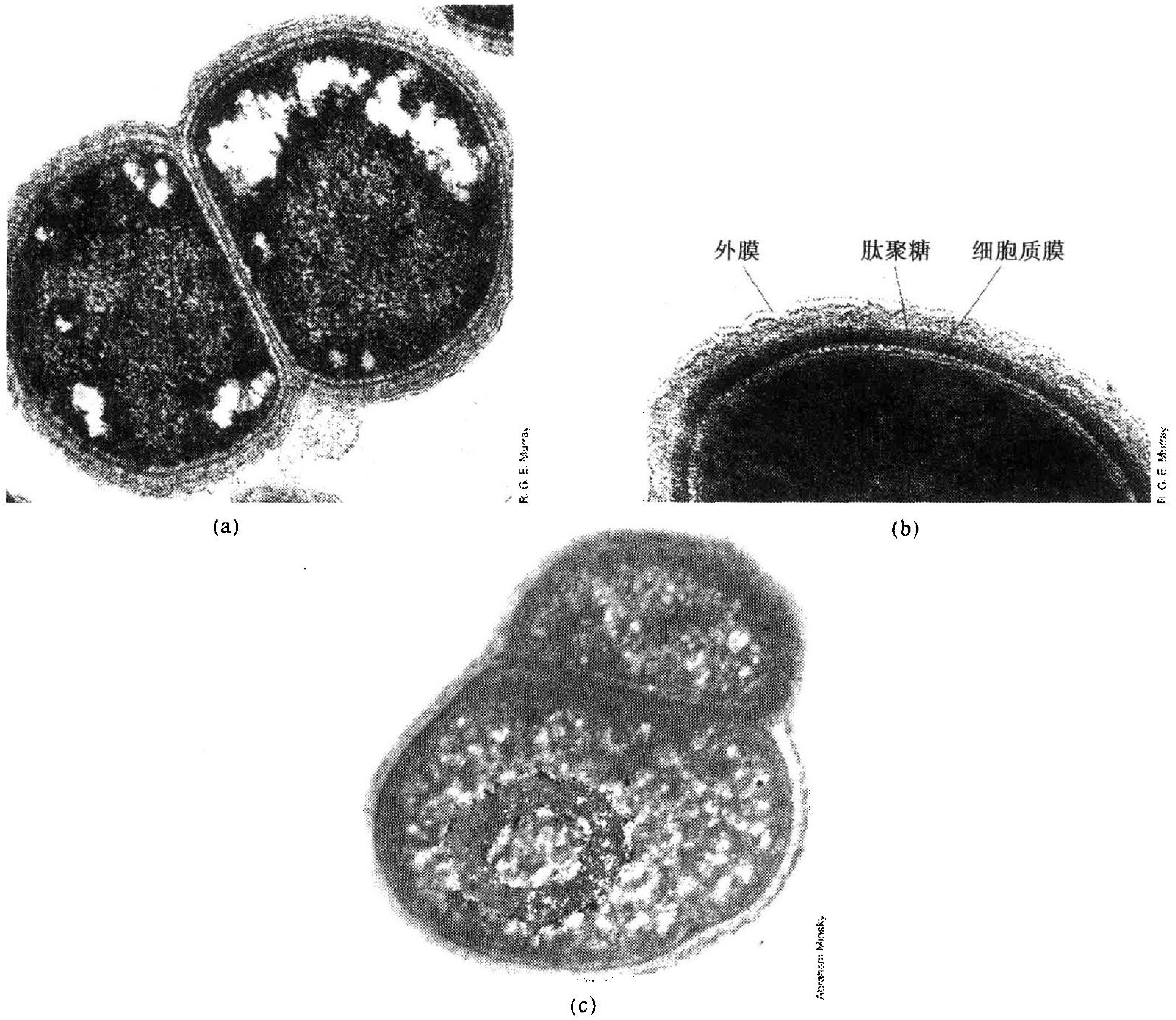
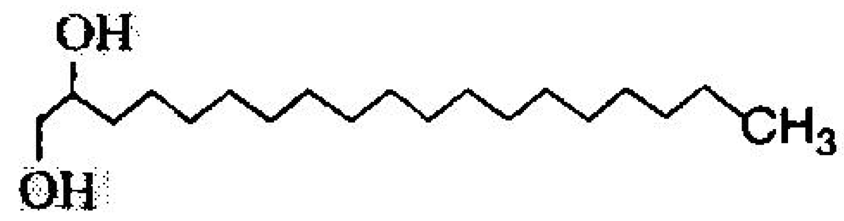


图 12.99 耐放射异常球菌（*Deinococcus radiopugnans*）的抗辐射。单个细胞的直径约 0.25μm。（a）耐放射异常球菌的透射电子显微照片，标注外膜层。（b）细胞壁层的高倍显微照片。（c）耐放射异常球菌的透射电子显微照片，颜色显示了拟核（绿色）的螺旋形态。

放射异常球菌形成环状结构（图 12.99c）。通过整合邻近组成的核酸使修复得以进行，这为同源重组提供了平台。因存在这种广泛重组，出现单个修复的染色体，含有这种染色体的细胞可以进行生长和分裂。

XIII 门 13：绿色非硫细菌

这个门的细菌进化情况比较清楚，仅包含一些属，最清楚的是厌氧光合型的光养生物绿屈挠菌属（*Chloroflexus*），所有已培养的代表菌均为嗜热菌。热微菌属（*Thermomicrobium*）是这个菌群中的一个化能营养型成员，且严格好氧，呈革兰氏阴性杆状，在天然培养基上 75℃生长最好。除了进化上的新颖，热微球菌膜脂也非常特别。细菌和真核生物的脂包含酯化了脂肪酸的甘油，而热微球菌的脂以 1,2-二乙醇来取代甘油，既没有酯也没有连接（图 12.100）。而且热微球菌的细胞不同于一般细菌种类，其缺乏肽聚糖，肽聚糖为原核生物细胞壁信号聚合体。



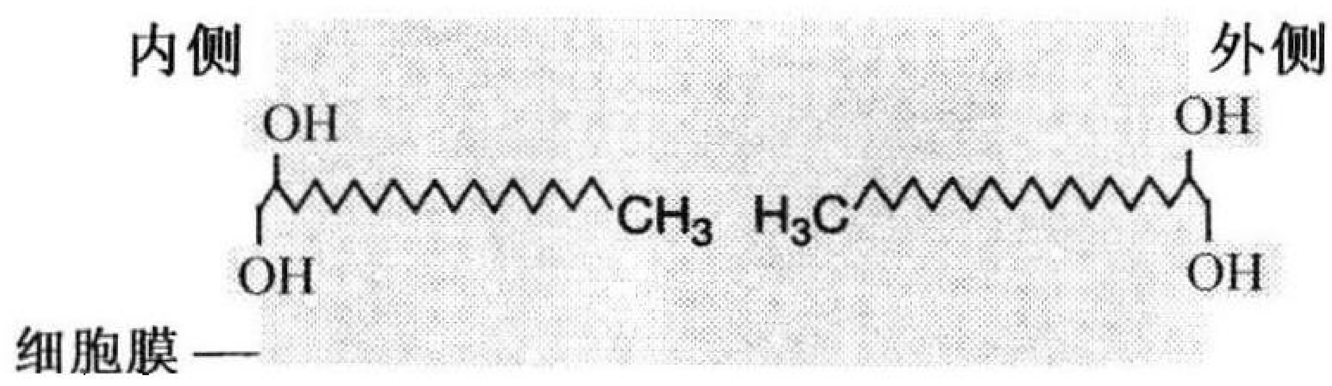


图 12.100　热微菌属特殊的脂。（a）玫瑰色热微菌（*T. roseum*）的膜脂像这里显示的（13-甲基-1,2-十九烷二醇）含有长链二醇。注意不像细菌和古生菌的脂（见 4.5 节），都没有酯和醚键侧链。（b）形成双层膜，二醇分子与甲基基团对应，—OH 基团作为内部和外部亲水表面，少量的二醇将脂肪酸酯化到次级—OH 基团上（红色显示），而初级—OH 基团（绿色显示）能结合像磷酸根离子的亲水分子。

12.35 绿屈挠菌属及其相关细菌

代表属：绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）、螺丝菌属（*Heliothrix*）、玫瑰弯菌属（*Roseiflexus*）

绿屈挠菌属和大部分其他绿色非硫细菌（如此命名是因为绿屈挠菌属的生理学原因，见后述）是丝状原核生物，和蓝细菌一样，在中性至碱性热泉水形成厚的微生物团（见图 12.101 和图 18.18a）。类似绿屈挠菌属的微生物也能在海洋微生物团中发现。虽然是无氧光养型，绿屈挠菌属却是个杂交的光养型，其光合机制呈现紫色细菌和绿色硫细菌的特征。与后者一样，绿屈挠菌属含有菌绿素 c 和叶绿体（图 12.92 叶绿体显微镜照片）。然而，绿屈挠菌属的菌绿素 a 位于细胞质膜上，组成一个结构与紫色细菌相似的光合反应中心（相反，绿色硫细菌的反应中心在结构上是不同的，图 17.18）。

因为其进化史和自养的独特机制（见后述），绿屈挠菌属可能是光合生物早期形式，首先进化形成一个光合反应中心，然后通过水平转移获得叶绿体特殊基因。从进化的立场看，绿屈挠菌属是光合细菌最早形式。

绿屈挠菌的生理学

从生理学角度来看，绿屈挠菌属因光合自养与紫色非硫细菌相似，然而，当以有机化合物作为碳源时，光合生长最好（光能异养型）。绿屈挠菌属在黑暗中通过有氧呼吸呈化能异养型，且生长良好。有趣的是，按照绿屈挠菌属进化位置这可能被认为是最古老的不产氧光养型生物（图 12.1），其自养过程是基于 CO_2 整合途径，羟基丙酸乙酯途径（hydroxypropionate pathway）有别于这个和一些其他系统发生较“古老”的生物。我们将在 17.7 节讨论这种新的自养途径的生物化学特征。

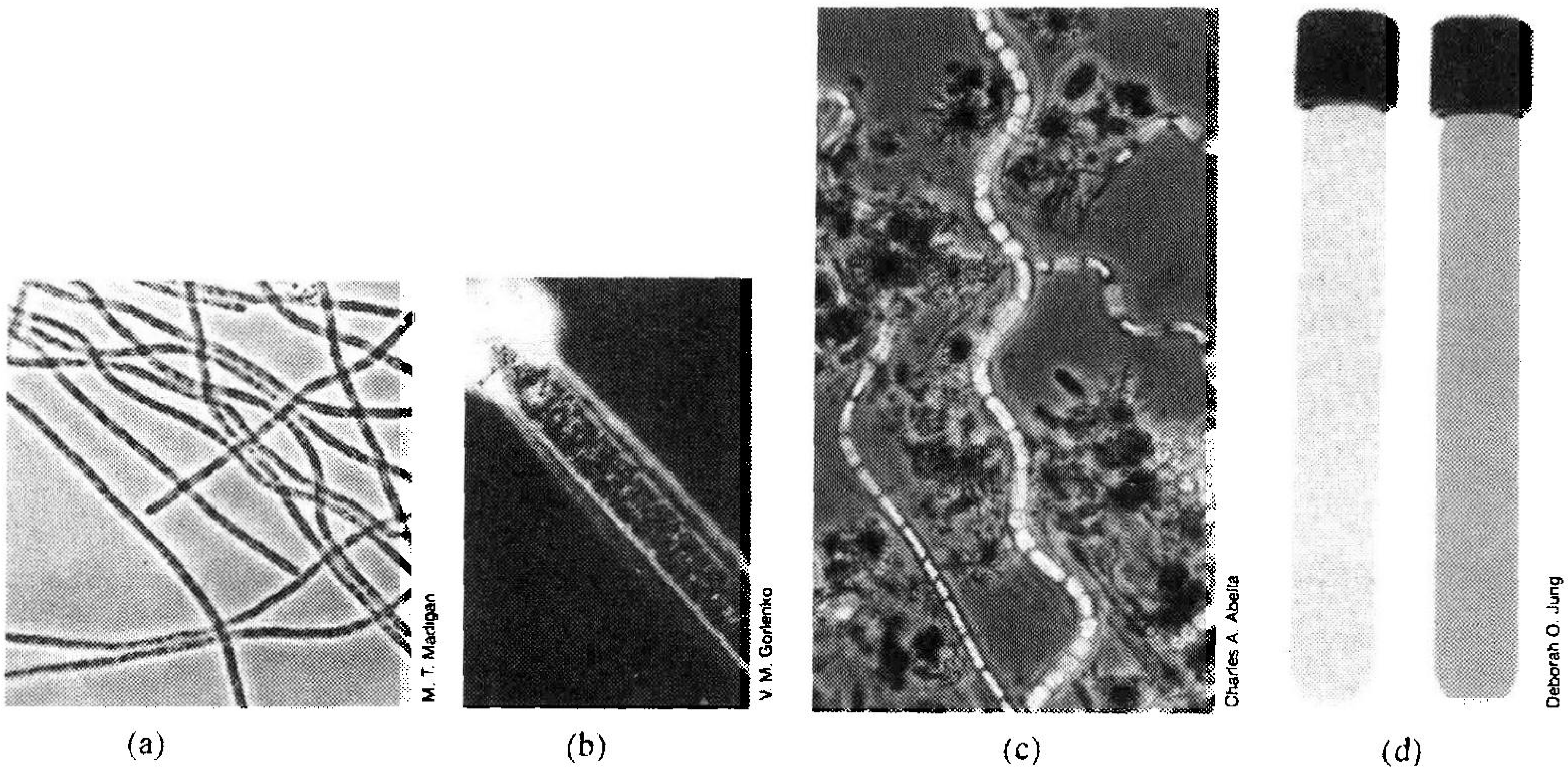


图 12.101 绿色非硫细菌。（a）嗜热光养型橙色绿屈挠菌（*Chloroflexus aurantiacus*）显微照片，细胞直径约 1μm。（b）大的光养型颤绿菌属显微照片，细胞大约 5μm 宽，亮的是夹具，用于黏附。（c）绿丝菌属生长在密歇根湖层中形成的丝状物显微照片，绿丝菌属细胞是波动丝状，直径约 2.5μm。（d）橙色绿屈挠菌（右边）和 *Roseiflexus*（左边）的试管培养物。玫瑰弯菌属缺乏菌绿素 c 和叶绿体（见 17.2 节和图 17.7），同时没有绿屈挠菌属的绿色。

其他绿色非硫细菌

除了绿屈挠菌属以外，其他原养绿色非硫细菌有嗜热的螺丝菌属（*Heliothrix*）和大细胞嗜温颤绿菌属（*Oscillochloris*）（图 12.101b）和绿丝菌属（*Chloronema*）（图 12.101c）。颤绿菌属和绿丝菌属非同一般，细胞相当大，2～5μm 宽，可达几百微米长（图 12.101c）。这两种生物都能生长在含有较低硫化物淡水湖中，与其他绿色硫细菌和紫色硫细菌一样。

绿色非硫细菌门中的玫瑰弯菌属和螺丝菌属与绿屈挠菌属有很大的不同。这些原养型缺乏菌绿素 c 和叶绿素，与绿屈挠菌属相比更接近原养紫色细菌（见 12.2 节）。尽管色素底物有所不同，绿屈挠菌属、玫瑰弯菌属和螺丝菌属有许多相同之处，如丝状形态和嗜热方式。如果绿屈挠菌属通过水平转移从绿色硫细菌中获得叶绿体和菌绿素 c 合成基因，在某点上绿屈挠菌属和玫瑰弯菌属的表型就不能分清。螺丝菌属不可纯培养，而玫瑰弯菌属可以。玫瑰弯菌属的细胞是丝状的，培养物因其大量的类胡萝卜素而呈黄色、橘黄色（图 12.101d）。

概念检查

异常球菌属和绿屈挠菌属分别都是细菌发育谱系中的代表属。耐放射异常球菌是已知最抗辐射的生物，绿屈挠菌属是不产氧原养型生物，显示紫色细菌和绿色细菌的光合特征。

◆ 耐放射异常球菌如何防止高水平辐射的杀伤？

◆ 绿屈挠菌属和玫瑰弯菌属哪些方面像绿菌属？哪些方面像红细菌属？

◆ 热微菌属的特征是什么？

XIV 门 14：深度分枝超嗜热细菌

细菌群的这 3 种门位于细菌进化树的“根部”（图 11.16 和图 12.1）。每个门含有一个或两个主要的属，其中大部分具有的一个主要生理特征是高度嗜热，在高于 80℃上生长最佳（见 6.10 节和 6.12 节）。

12.36 栖热袍菌属和热脱硫杆菌属

代表属：栖热袍菌属（*Thermotoga*）、热脱硫杆菌属（*Thermodesulfobacterium*）

栖热袍菌属呈杆状，能在 90℃生长（80℃最佳）。栖热袍菌属有个外壳膜（图 12.102a），革兰氏染色呈阴性，且不生成孢子。栖热袍菌属是厌氧化能有机营养型，代谢糖和淀粉等聚合物，产生乳酸盐、醋酸盐、CO_2和 H_2代谢产物。这种生物也能利用 H_2作电子供体和 Fe^{3+}作电子受体进行无氧呼吸。栖热袍菌属菌种已从海洋高温火山口和地面热泉中分离出来。

栖热袍菌属的基因组已完全测序。有趣的是，这种生物有许多古基因。实际上，栖热袍菌属 20%以上的基因可能是通过古生菌嗜热菌种水平转移形成的（见 15.8 节）。

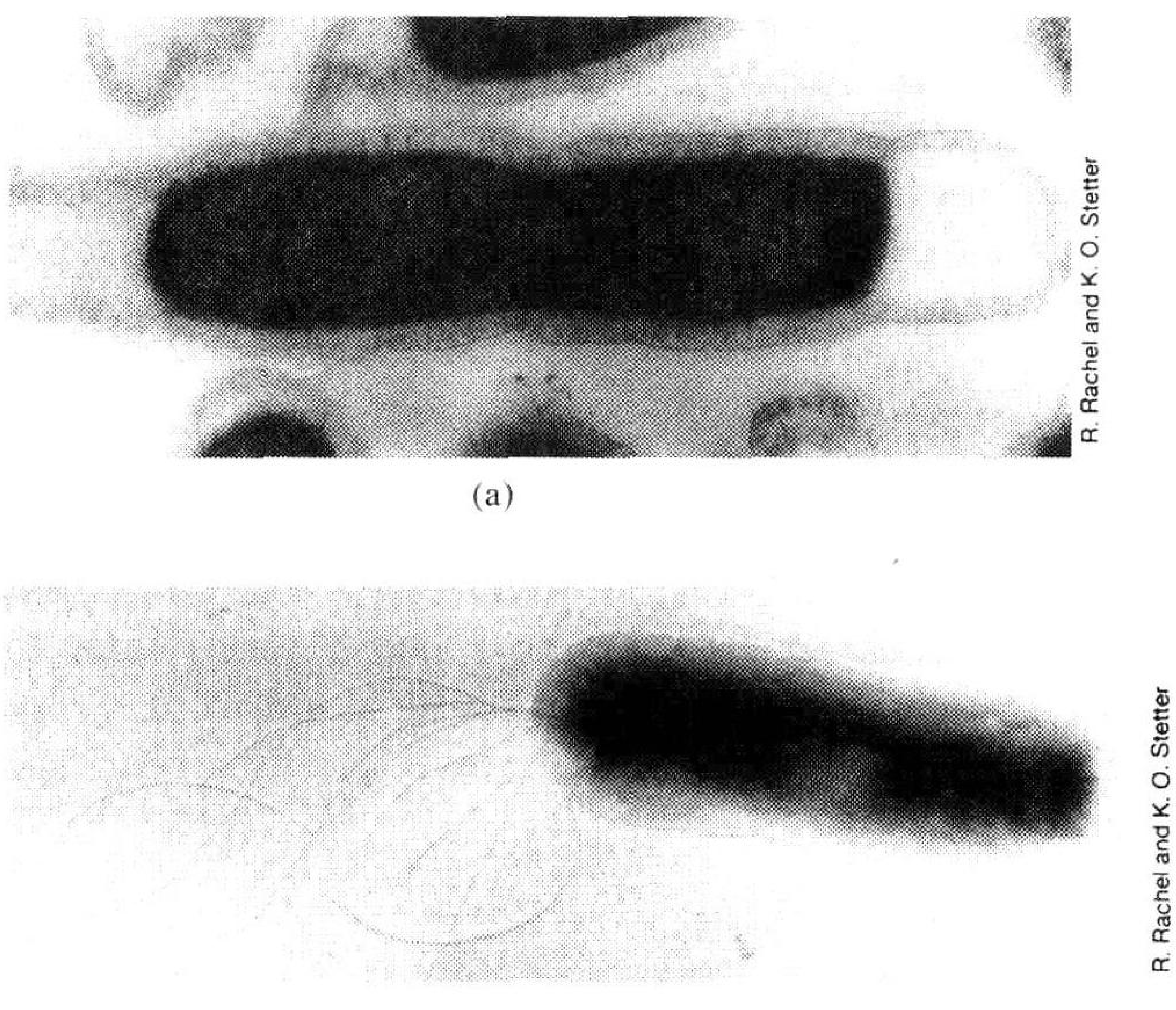


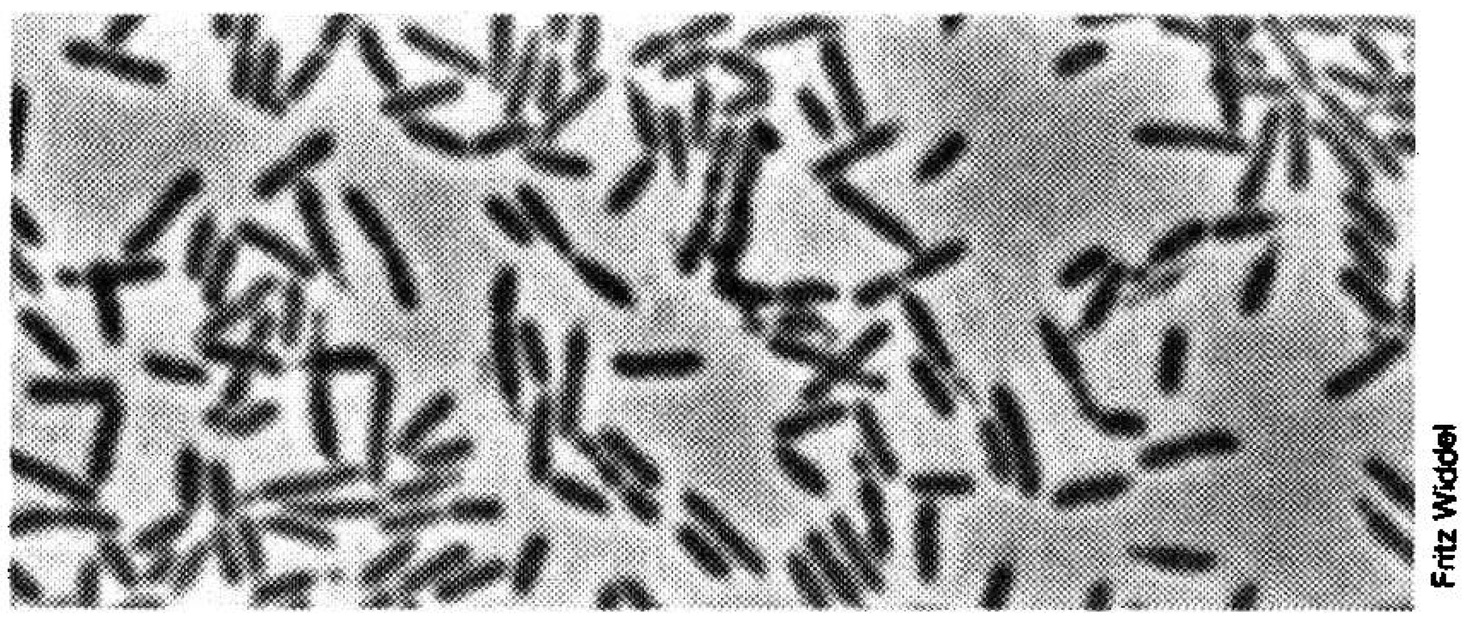
图 12.102 超嗜热菌。海栖热袍菌（*Thermotoga maritima*）——最佳温度 80℃。注明细胞的外层（“袍”）；嗜火产液菌（*Aquifex pyrophilus*）——最佳温度 85℃。栖热袍菌属（*Thermotoga*）的细胞（薄片）大小 0.6μm×3.5μm；产液菌属（*Aquifex*）（冷冻断裂显微照片）大小 0.5μm×2.5μm。栖热袍菌属和产液菌属在细菌进化树上都形成自己的发育系（图 12.1）。

许多古生菌与栖热袍菌属共存于热的聚集处，可能是栖热袍菌属与古生菌实行广泛的水平基因转移，这样栖热袍菌属能获得一些用于极端条件下生存的基因。虽然在其他一些细菌中也发现一些类似古生菌的基因，然而仅在栖热袍菌属中存在如此大的水平转移的基因。

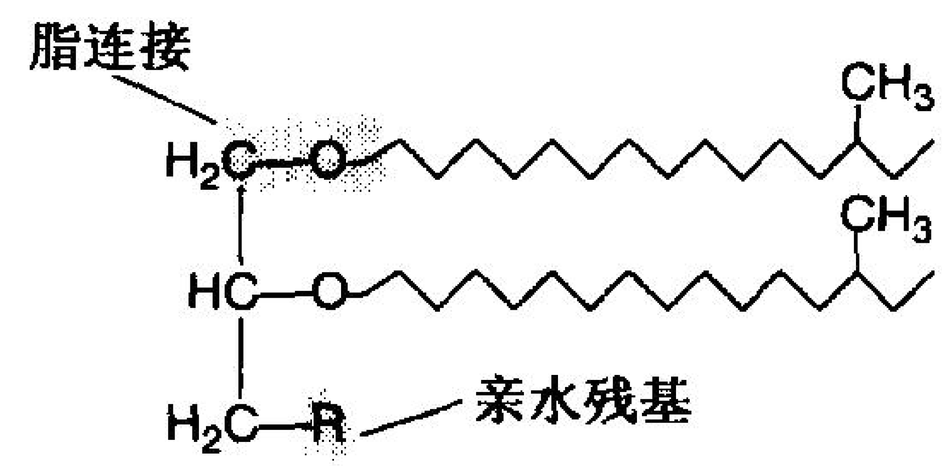
热脱硫杆菌属

热脱硫杆菌属（图 12.103a）是嗜热的硫酸盐还原细菌，在进化树上位于栖热袍菌属和产液菌属（*Aquifex*）之间的门（图 12.1）。虽然不是真正的超嗜热型，因其最佳生长温度是 70℃，热脱硫杆菌属是已知硫酸盐还原菌中最嗜热的（古生菌硫酸盐还原古球菌属是真正的超嗜热菌，见 13.7 节）。像其他Ⅰ组硫酸盐还原菌（见 12.18 节），热脱硫杆菌属是严格厌氧生物，在其能量代谢中不能利用醋酸盐作为电子供体，而是使用乳酸盐、丙酮酸盐和乙醇作为电子供体、将 SO_4^{2-} 还原为 H_2S。

热脱硫杆菌属菌种一个不寻常的生化特征是其有醚键酯，这是古生菌的一个特点，一个聚类异戊二烯 C_{20}烃（植烷）在古生菌的酯中以侧链形式取代脂肪酸（见 4.5 节和 11.9 节）。醚键酯在热脱硫杆菌属中是不寻常的，因为其是甘油侧链而不是古生菌中的植烷基因（见 4.5 节），是一个独特的有一些脂肪酸的 C_{17}烃（图 12.103b）。



(a)



(b)

图 12.103 热脱硫杆菌属（*Thermodesulfobacterium*）。（a）运动热脱硫杆菌（*Thermodesulfobacterium mobile*）细胞的显微照片。（b）运动热脱硫杆菌一个脂的结构。注释虽然这些是醚键，但是两个疏水的侧链不是细菌中的植烷单元（见 4.5 节）。“R”代表亲水残基，像磷酸基团。

因此我们在热脱硫杆菌属中发现深度进化系（图 12.1）和结合有古生菌与细菌的酯的特征（图 12.103b）。与栖热袍菌属一样，这可能是另一个基因从古生菌中水平转移到细菌的实例。然而，蓝细菌，低 GC 的革兰氏阴性菌能氧化 H_2至 NO_3生成 NH_3进行无氧生长，而热脱硫杆菌属一样含有脂。因此，醚键脂可能与先前认为更广泛存在于细菌中。

12.37 产液菌属、热环菌属及其相关细菌

代表属：产液菌属（*Aquifex*）、热环菌属（*Thermocrinis*）

产液菌属（图 12.101b）是严格的化能无机营养型且自养的超嗜热菌，是已知最嗜热的细菌。各种产液菌属种以 H_2、S^0或 $S_2O_3^{2-}$ 作为电子供体，以 O_2或 NO^{3-} 作为电子受体，能在 95℃上生长（最适 85℃）。产液菌属仅能耐受很低的 O_2浓度，但其仍然

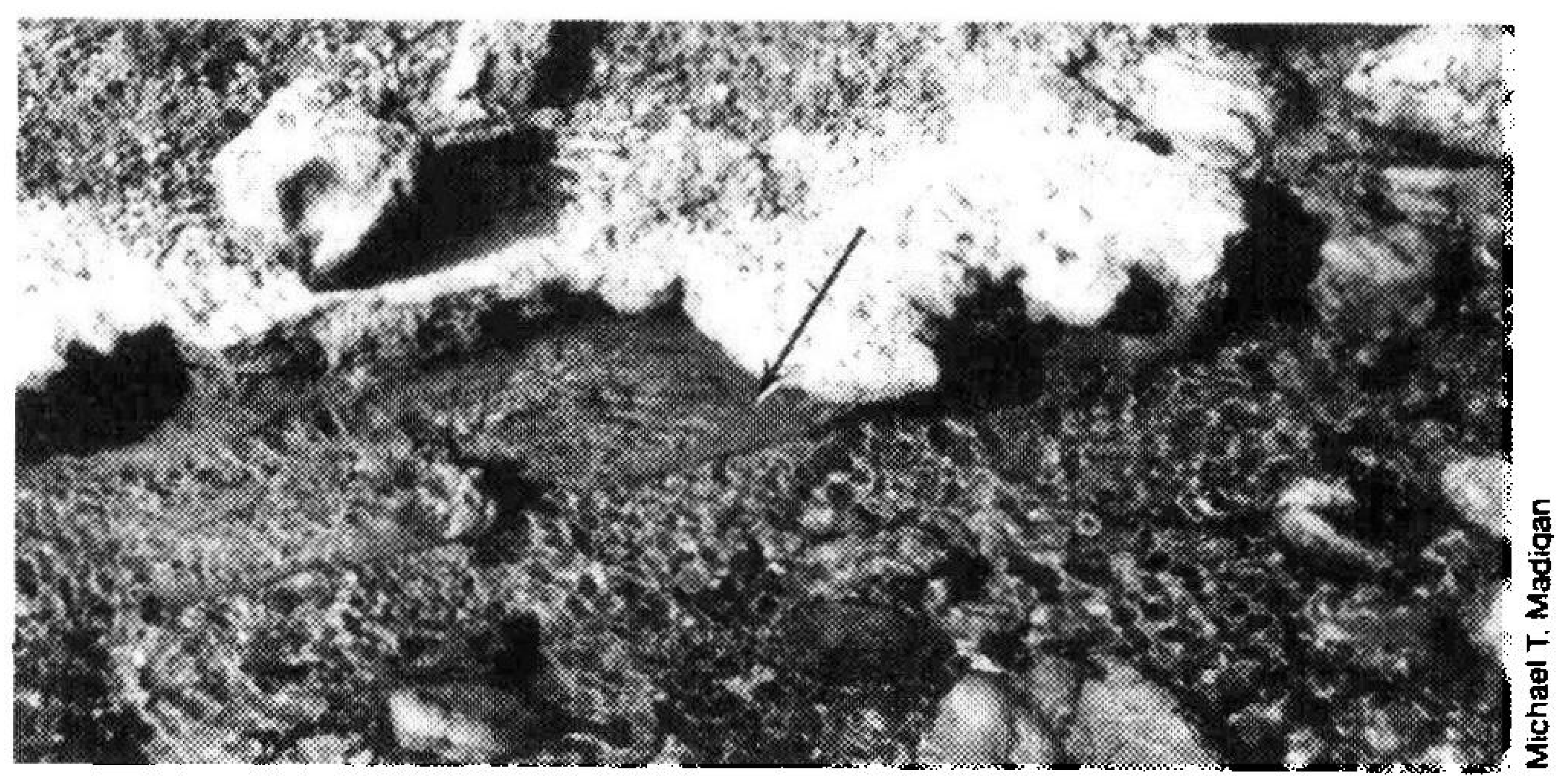
（与其他一些古生菌一样，见 13.5 节和 13.9 节）是已知较少的有氧的（严格上讲是微好氧的）嗜热菌之一。产液菌属的营养学研究说明其不能完全在有机化合物上营化能有机营养生长，包括酵母粉和牛肉膏一样的复杂化合物。产氢杆菌属，与产液菌属相近，有产液菌属大部分特征，但是一个严格的需氧菌。

产液菌属的自养过程依赖于逆柠檬酸循环中的酶，这一途径最早在绿色硫细菌中发现（见 12.32 节和 17.7 节）。产液菌属的全基因组序列已确定（见 15.3 节），其化能自养和原养生活方式是由仅 15.5Mb（大肠杆菌基因组的 1/3）的基因组控制。在 11.2 节关于早期生命形式的生理特征已讨论过这件事。

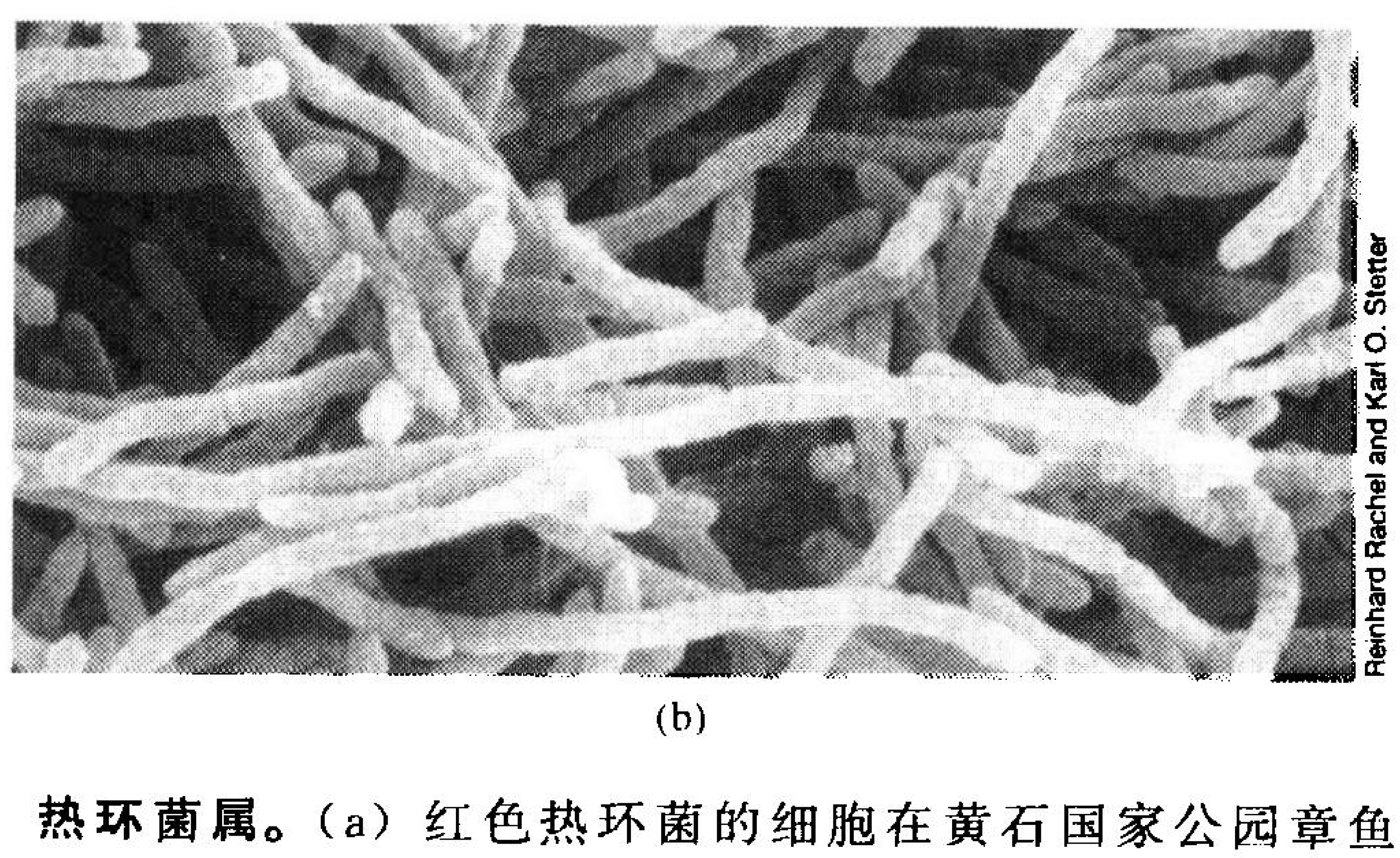
现已发现有许多超嗜热菌，包括古生菌和像产液菌属细菌这类的，都是 H_2化能无机营养生物，同时发现它们在各自进化树上的分支较早（图 11.13、图 12.1 和图 13.1），说明 H_2是在早期地球环境下原始生命的主要的电子供体（见 13.13 节）。利用氢气产生质子动力和以 ATP 作为可用的能量的简单模型如图 11.6 显示。

热环菌属

热环菌属（图 12.104）使得产液菌属和产氢杆菌属具有相关性，该属高度嗜热（最佳生长温度是 80℃），化能无机营养，能氧化 H_2、硫代硫酸盐或硫，使其作为电子供体，以 O_2作为电子受体。



(a)



(b)

图 12.104　热环菌属。（a）红色热环菌的细胞在黄石国家公园章鱼泉出口处（85℃）以丝状物形式生长在硅土泉华上，粉红色为类胡萝卜素。（b）生长在硅层玻璃板上的红色热环菌杆状细胞的扫描电子显微照片，头发状的为硅，红色热环菌单个细胞直径大约 0.4μm，长 1～3μm。

红色热环菌（*Thermocrinis ruber*）是黄石国家公园某热泉流出物中已知的唯一菌种，能形成粉红色“条状物”（streamer），是由细胞形成的丝状物连到硅华上形成（图12.104a）。在静止培养中，红色热环菌的细胞以单独杆状细胞形式生长（图12.104b）。然而，当培养在流动系统中，生长培养基慢慢流过细胞能吸附的玻璃表面，热环菌属能形成条状形态，像在自然界中的存在状态一样（图12.104a）。

红色热环菌在微生物学中具有重要的历史意义，它是Thomas Brock在20世纪60年代研究的微生物之一，Thomas Brock是高温生物学的先驱。Brock发现红色条状物（图12.104a）含有蛋白质和核酸，清楚地说明它们是生命有机体而不仅仅是矿质碎屑。而且，条状物仅在80～90℃的热泉出口而不是在低温下出现，支持了Brock关于热泉微生物需要高温生长甚至在沸水中存在的观点。这两个结论最后都由Brock等在热泉、高温火山口和其他高温环境中发现数十种嗜热原核生物而得到证实。6.10节、6.12节、13.4～13.13节和19.8节关于嗜热菌有更多研究。

XV　门15：硝化螺菌属和铁还原杆菌属

12.38 硝化螺菌属、铁还原杆菌属及其相关细菌

代表属：硝化螺菌属（*Nitrospira*）、铁还原杆菌属（*Deferribacter*）

通过对培养物的核糖体RNA测序鉴定，得到另外几个门的细菌，虽然对其了解较少。其中有两个门包括硝化螺菌属和铁还原杆菌属（图12.1）。从生理学角度来看，这些微生物可能是化能无机营养型，也可能是化能有机营养型，嗜温到嗜热范围很广。

类似硝化变形细菌（图12.3和图17.12），硝化螺菌属氧化NO_2^-成NO_3^-，且自养生长。尽管在生理特征上与经典硝化细菌相近，但是在进化关系上差别明显。同样，硝化螺菌属缺少硝化变形菌属中广泛存在的内膜（图12.7和图12.8）。尽管如此，硝化螺菌属与硝化变形细菌存在的环境一样，可能是通过从硝化变形菌属中水平转移基因所致（或相反）。我们所知许多生理特征的机制在原核生物中广泛存在（见10.6～10.12节）。

硝化螺菌属中的其他属包括*Leptosoirillum*，与煤和铁的矿化有关，提供矿化过程所需的酸（见19.5节）；热脱硫弧菌属（*Thermodesulfovibrio*）。前者是铁氧化化能无机营养型，后者是嗜热硫酸盐还原菌，生长在热泉微生物系中（见18.7节）。需要说明的是，尽管在名字和生理上相似，热脱硫弧菌属和热脱硫杆菌属（见12.36节）在进化上还比较清楚。

铁还原杆菌属

铁还原杆菌形成自身清晰的门（图12.1），包括一些能专门用于无氧能量代谢的菌种。这个种群中的其他属包括地弧菌属（*Geovibrio*）和*Flexistipes*，后者是专性厌氧发酵细菌。

铁还原杆菌属和地弧菌属在无氧呼吸上是极其广泛的，能使用几种电子受体，包括

Fe^{3+}和Mn^{4+}。我们在第 17 章中讨论无氧呼吸，同时说明这个过程与许多不同的终端电子受体联系在一起。铁还原杆菌属部分能够使用两者择一的电子受体，且属厌氧菌。相反，大部分生物以硝酸盐或金属作为电子受体进行无氧呼吸生长，属兼性厌氧型，能够像无氧呼吸一样通过完全有氧呼吸生长（见 17.13 节）。

概念检查

栖热袍菌属、热脱硫杆菌属和产液菌属生长在高温下，每个都位于细菌发育系的开始。产液菌属和热脱硫杆菌属是H_2氧化化能无机营养型，而栖热袍菌属和热脱硫杆菌属是无氧化能有机营养型。产液菌属和铁还原杆菌属分别形成各自的门。

- 比较栖热袍菌属和热脱硫杆菌属的分解代谢。
- 热脱硫杆菌属膜脂的不寻常之处是什么？
- 从基因组角度来看，为什么产液菌属能从气体$H_2+CO_2+O_2$生长的事实显得不一般？
- 对比硝化螺菌属和铁还原杆菌属的代谢特征。

复习题

1. 这一章已学的所有门的细菌，哪个组有最多的不同生理特征？依O_2需求、碳源利用和能量代谢举例。
2. 举例说明革兰氏反应具有进化前瞻性价值。
3. 蓝细菌与原核绿藻的相同之处是什么？与叶绿体呢？三者又是怎么形成进化关系的？
4. 浮霉状菌门的菌种与古生菌的相同之处是什么？与真核细胞呢？
5. 绿菌属和绿屈挠菌属的相似之处是什么？什么方面又不同？
6. 描述下列细菌的主要生理特征，以与其他区分：醋杆菌属、甲基球菌属、固氮菌属、脱硫弧菌属、乳杆菌属、硝化杆菌属、颤蓝细菌属。
7. 描述能区分下列细菌的主要形态特征：链球菌、螺菌属、链霉菌属、疣微菌属和螺旋体属。
8. 哪些主要的特征能区分下列革兰氏阳性菌的属：芽孢杆菌属、支原体和分枝杆菌属？
9. 衣原体和立克次氏体共同特征是什么？什么方面又不同？
10. 哪些主要的生理特征将栖热袍菌属、产液菌属和热环菌属联系在一起？
11. 比较和对照紫色非硫细菌和绿色非硫细菌的代谢、形态和进化史。
12. 列出每个下列细菌能量代谢的一个电子供体，同时指出有机体属于有氧呼吸还是无氧呼吸：硫杆菌属、亚硝化单胞菌属、罗尔斯通氏菌、甲基单胞菌属、醋杆菌属、嘉利翁氏菌属和丙酸杆菌属。

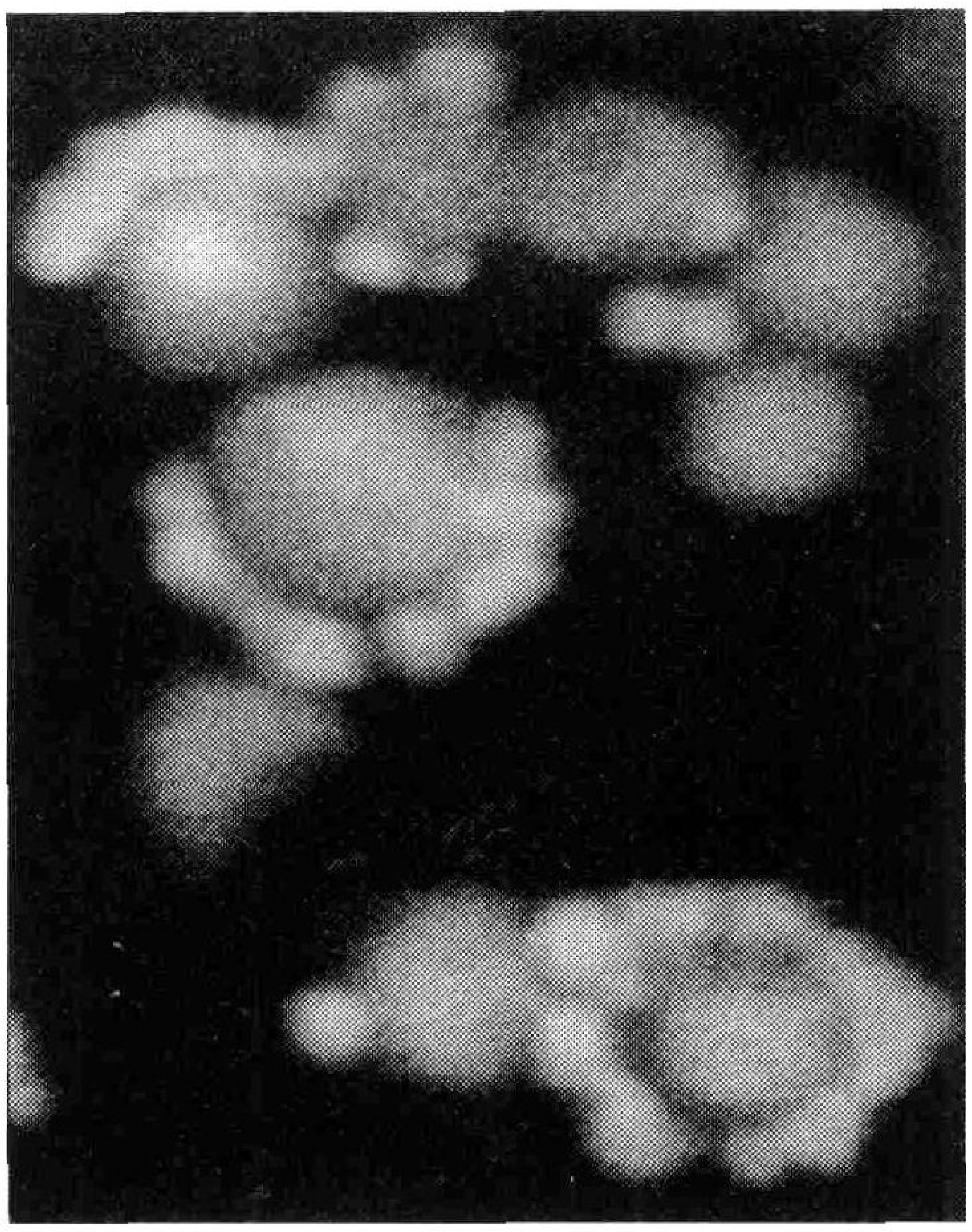
应用题

1. 从系统发育、结构和生理学的角度论述以下观点：“大肠杆菌比热脱硫杆菌进化上更高级”。
2. 用此章中的例子论证或驳斥以下观点：①细胞形态对系统发育毫无预测性；②生理对系统发育毫无价值。

（马　挺　译，宋存江　校）

13

原核生物的多样性：古生菌



古生菌（*Archaea*）包括超嗜热、寄生生活的纳米古生菌属（*Nanarchaeum*）（红色的细胞）。在所有已知的原核生物中，纳米古生菌属的基因组最小。

词汇表

乙酸营养型（acetotrophic）：能利用消耗乙酸的营养型

乙酰辅酶 A 途径（acetyl-CoA pathway）：一种自养型固定 CO_2 的途径，广泛存在于专性厌氧的产甲烷菌、同型乙酸和硫酸盐还原细菌中

菌紫红质（bacteriorhodopsin）：一种含有视黄醛的膜蛋白，由某些极端嗜盐菌产生，能够形成由光介导的质子动力

相容性溶质（compatible solute）：有机的或无机的物质，在嗜盐生物体的细胞质内积聚，以维持渗透压

泉古生菌门（Crenarchaeota）：古生菌的一个门，包括超嗜热原核生物和冷环境原核生物

广古生菌门（Euryarchaeota）：古生菌的一个门，包括早期的产甲烷菌、极端嗜盐菌、热原体属和一些海洋种类

极端嗜盐菌（extreme halophile）：一种生长依赖于高浓度 NaCl（通常大于或等于 10%）的生物

盐细菌视紫红质（halorhodopsin）：一个光驱动的氯离子泵，可以在细胞质积聚 Cl^-

热水流火山口（hydrothermal vent）：深海的热喷泉，喷出温热（约 20℃）至过热（>300℃）的水

超嗜热菌（hyperthermophile）：一种在 80℃或更高温度下生长的原核生物

古生古生菌门（Korarchaeota）：超嗜热古生菌的一个门，是古生菌进化树根部的一个分支

产甲烷菌（methanogen）：一种产甲烷的原核生物，能利用 CO_2 和 H_2 产生 CH_4 或由某些有机物产生 CH_4

纳米古生菌门（Nanoarchaeota）：一种非常小的寄生古生菌，接近古生菌进化树的根部

植烷基（phytanyl）：一种苯环上带有 20 个碳原子烃链的化合物，出现在古生菌的类脂中

反向 DNA 促旋酶（reverse DNA gyrase）：在超嗜热菌中普遍存在的一种蛋白质，能向环状 DNA 中引入正超螺旋

硫磺温泉（solfatara）：一种热的、富硫环境，一般呈酸性，通常是超嗜热古生菌的栖息地

热聚体（thermosome）：一种热激蛋白（伴侣蛋白）复合物，能够重新折叠超嗜热古生菌中已部分热变性的蛋白质

现在我们开始讨论古生菌域（*Archaea*）。在第 11 章我们曾强调，细菌域（*Bacteria*）的系统发育及其表型不同于古生菌，这里我们将比较它们的有机体。古生菌的主要特征包括：细胞壁具有以醚键连接的类脂（ether-linked lipid）、不含肽聚糖，以及复杂的 RNA 聚合酶（表 11.3）。除此之外，古生菌的表型呈现出庞大的多样性，在此我们将要介绍这些方面。正如介绍第 12 章的细菌一样，在古生菌这章，我们从其系统发育的概述开始，来揭示古生菌的进化关系。

Ⅰ 系统发育及基本的新陈代谢

13.1 古生菌系统发育的概述

古生菌的系统进化树见图 13.1。进化树主要分为泉古生菌门（Crenarchaeota）和

广古生菌门（Euryarchaeota）。另外两个门——古生古生菌门（Korarchaeota）和纳米古生菌门（Nanoarchaeota）位于进化树的根部（图 13.1）。在可培养的古生菌中，泉古生菌门包括了大部分的超嗜热种类——最适生长温度高于 80℃的生物，包括所有已知的那些能在最高温度下生长的生物。很多超嗜热菌（hyperthermophile）属于化能无机自养型，并且它们的栖息地没有光合营养生物，所以它们是这些恶劣环境中唯一的初级生产者。

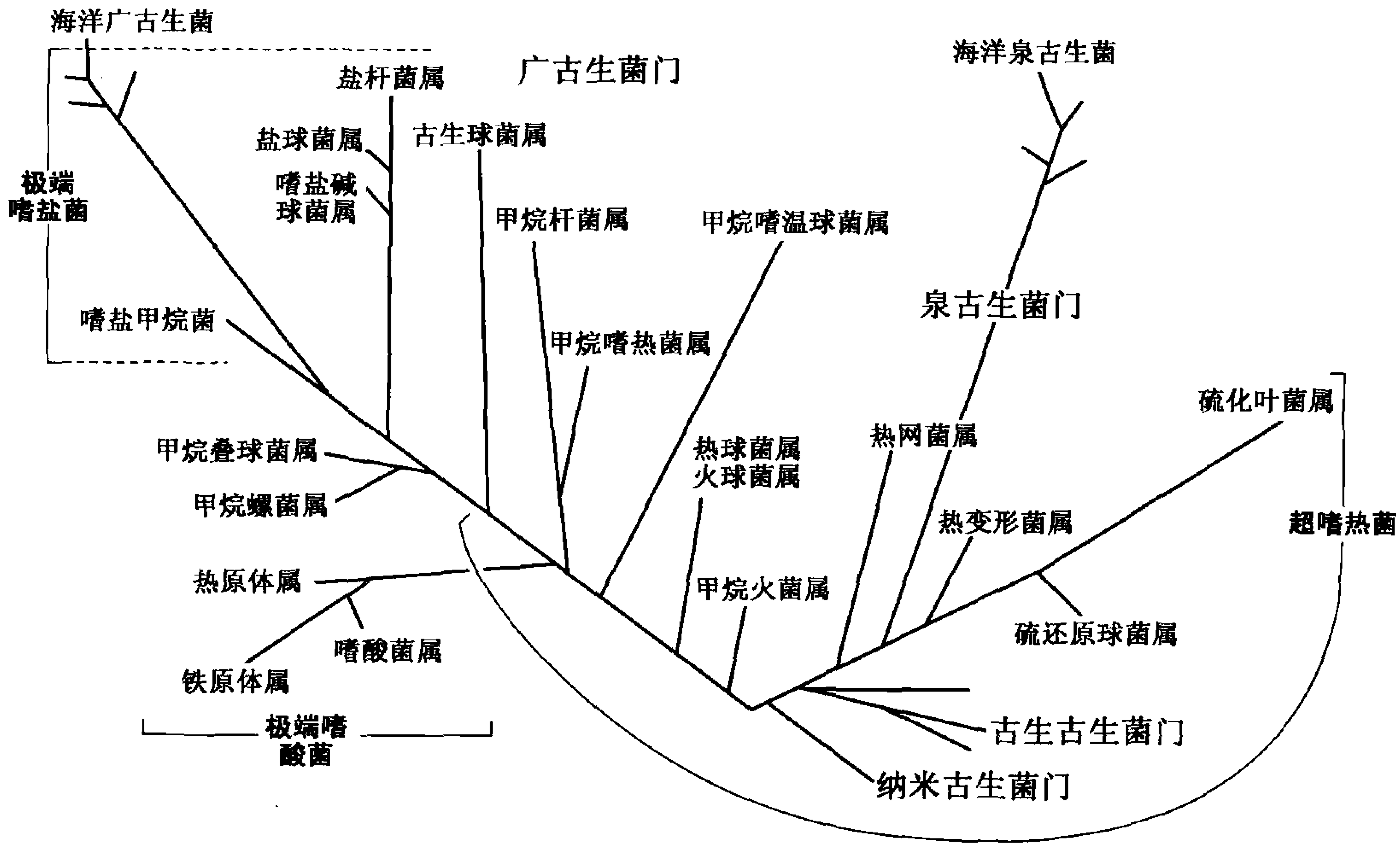


图 13.1　根据 16S rRNA 基因序列比对绘制的古生菌详细的系统发育树。迄今为止仅通过群落采样分析对海洋广古生菌和泉古生菌有所了解（见 11.7 节、18.5 节和 18.6 节）。并非所有的甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）种类都是超嗜热菌。

基于 16S 核糖体 RNA 为分类标准的进化树上，泉古生菌门的超嗜热菌以短枝形成紧密的簇（图 11.13 和图 13.1）。这意味着此类生物的进化速率慢于古生菌的其他谱系。泉古生菌门可能是最早的生命形式，可作为“早期”古生菌的典型模式，我们将在这章的结尾部分讨论这个问题（见 13.13 节）。相比之下，与泉古生菌门中超嗜热菌有亲缘关系的冷环境菌，也已通过对核糖体 RNA（rRNA）基因的群落采样分析（community sampling），从海洋古生菌中鉴定出来（见 18.5 节和 19.6 节）。总的来看，这些冷环境菌进化较快，分枝较长（图 13.1）。在 13.8 节～13.10 节我们将详述泉古生菌门。

广古生菌门包括生理多样的古生菌类群。与泉古生菌门相似的是，许多广古生菌也栖息于各种极端环境中。广古生菌门包括产甲烷古生菌［其代谢与产甲烷（CH_4）有关］和极端嗜盐古生菌的几个属［又称为“盐杆菌”（halobacteria）］（图 13.1）。两个种群的生理特征有明显不同，产甲烷菌（methanogen）是严格厌氧菌（strict anaerobe），而极端嗜盐菌（extreme halophile）大部分是专性需氧菌（obligate aerobe）。

广古生菌门的其他种群包括超嗜热菌——热球菌属（*Thermococcus*）、火球菌属（*Pyrococcus*）及产甲烷的甲烷火菌属（*Methanopyrus*），这些属在进化树上的分枝靠近根部（图 13.1）；还包括一种无细胞壁的原核生物——热原体属（*Thermoplasma*），其表型类似于支原体（*mycoplasma*）（见 12.21 节）。最后，大多数目前尚不可培养、生活在海洋的广古生菌，在接近进化树的顶部形成长枝，与泉古生菌门平行（图 13.1）。许多广古生菌也栖息于淡水或陆地，我们将在 13.3 节～13.7 节对广古生菌门进行更为详细的介绍。

古生古生菌门的发现最初是源于对黄石温泉中生物群体的 rRNA 基因群落采样分析（图 13.1），目前还不存在古生古生菌的纯培养物。正式的分类学还不认可古生古生菌门，但这类生物在古生菌进化树的根部形成了一个明显的分枝，因此，它们的生物学特征可能与那些古老的古生菌相似。

纳米古生菌门是最近被加入到古生菌领域的。纳米古生菌属（*Nanoarcheum*）是此门唯一的属，其个体较小，寄生于泉古生菌门的火焰球菌属（*Ignicoccus*）。纳米古生菌属的细胞和基因组非常小，具有原始的系统发育，这使其成为非常有趣的生物（表 15.1）。我们将在 13.11 节详细讨论纳米古生菌门。

对古生菌的系统发育有一个总的认识后，我们将先介绍其代谢特征，随后介绍可培养古生菌的典型代表。

13.2 古生菌的能量守恒和自养作用

产甲烷菌是古生菌的一个主要类群，其能量代谢不同于细菌、古生菌等其他原核生物。我们将在第 17 章讨论产甲烷作用（methanogenesis）的一些新特征，这里我们主要讨论不产甲烷的古生菌的代谢，它们的代谢与细菌的代谢很相似。

古生菌的化能有机营养和化能无机营养

有些古生菌是化能有机营养类型并且是以有机物作为生长的能源。在古生菌中，葡萄糖的分解是通过略微改变的恩-杜氏（Entner-Doudoroff）途径（见 12.7 节）或糖酵解途径进行的（见 5.10 节）；乙酸盐氧化成 CO_2 则通过柠檬酸循环（citric acid cycle）（反应链可能有微小的改变）（见 5.13 节）或乙酰辅酶 A 途径（acetyl-CoA pathway）（见 17.16 节）来进行。在古生菌中有关氨基酸和其他大分子前体的生物合成则知之甚少。然而，据推测，关键性的单体是由曾在细菌中讨论过的中心生物合成的中间体产生的（见 5.15 节～5.17 节）。

一些古生菌的电子传递链含有细胞色素 a、b 和 c。对化能有机营养型古生菌来说，有机的电子供体通过细胞色素 a、b、c 或其他电子载体传递电子，最终将 O_2、S^0 或其他电子受体还原。伴随着这些过程，质子驱动力形成，通过驱动膜结合的 ATP 酶合成 ATP（见 5.12 节所描述的 ATP 酶功能）。化能无机营养类型也出现在以 H_2 为电子供体的古生菌中（见 13.3 节）。在 13.8 节我们将介绍超嗜热古生菌的化能无机营养代谢。

古生菌的自养作用

自养作用广泛存在于古生菌，并且古生菌以几种不同的途径进行自养。在产甲烷菌及许多化能无机营养的超嗜热菌中，CO_2固定是通过乙酰辅酶A途径或某些修饰途径完成的（见17.16节）。而在其他的超嗜热菌中，CO_2固定则通过类似绿硫细菌自养途径中的逆向柠檬酸循环（reverse citric acid cycle）来完成（见12.32节和17.7节）；或者通过广泛存在于细菌和真核生物的卡尔文循环（Calvin cycle）来完成CO_2固定（见17.6节）。目前已从超嗜热的詹氏甲烷嗜温球菌（*Methanocaldococcus jannaschii*）和火球菌属中鉴定出RubisCO酶（此酶催化卡尔文循环中第一步反应）的基因，该基因可编码有功能的热稳定的RubisCO酶。

现在我们知道，古生菌代谢的很多反应与某些细菌的代谢反应相似，这说明新陈代谢有漫长的进化史。以此为背景，我们开始研究古生菌的生物多样性。

概念检查

古生菌主要有4个门：广古生菌门、泉古生菌门、古生古生菌门和纳米古生菌门。除了一些古生菌有产甲烷作用外，多数古生菌的生物能、中间代谢与细菌类似。

◆ 可培养的超嗜热菌大都属于古生菌的哪一门？

◆ 古生菌有哪些自养途径？

Ⅱ 广古生菌门

13.3 极端嗜盐古生菌

主要属：盐杆菌属（*Halobacterium*）、富盐菌属（*Haloferax*）、嗜盐碱杆菌属（*Natronobacterium*）

极端嗜盐古生菌（extremely halophilic *Archaea*）（图13.1）的种类多种多样，它们栖息在高盐的环境，如水分蒸发后含盐的池塘、自然的盐湖或鱼和肉类等人工高盐食物表面。这样的栖息地通常被称为超盐区（hypersaline）。极端嗜盐菌（extreme halophile）是指这样一些生物，它们不仅嗜盐，而且对盐的需求很高，在某些情况下接近盐的饱和度。一般认为，极端嗜盐菌的生长至少需要1.5mol/L（约9%）NaCl，但大部分极端嗜盐菌的最适生长盐浓度为2～4mol/L（12%～23%）NaCl。实际上，所有的极端嗜盐菌都能在5.5mol/L NaCl（32%，NaCl的饱和浓度）中生长，尽管有些种在这样的盐浓度下生长很慢。

超盐环境

超盐环境遍及世界各地，但极端超盐的场所比较稀少。大多数极端超盐的环境处于世界上的酷热、干燥地域。盐湖的离子组分变化很大，主要的离子组分很大程度上取决

于周围的地理、地形以及气候条件。

例如，美国犹他州大盐湖（Great Salt Lake）（图 13. 2a）实际上是被浓缩的海水，尽管各种盐离子的浓度很高，但比例关系却与海水一致。在大盐湖中，Na^+是主要的阳离子，Cl^-是主要的阴离子，硫酸盐的存在使湖水偏碱性（表 13. 1）。相比之下，其他超盐的地域如死海，Na^+含量相对要低，但Mg^{2+}的含量却很高（表 13. 1）。

碱湖的化学成分类似于大盐湖，但因为周围岩石的碳酸盐（carbonate）矿物成分很高，所以碱湖的 pH 也非常高。在这些地域中，水的 pH 达 10～12 是很平常的事（表 13. 1 和图 13. 2c）。另外，碱湖中几乎没有Ca^{2+}和Mg^{2+}，因为在高 pH 和高碳酸盐浓度下，这些离子会被沉淀下来（表 13. 1）。

表 13. 1 某些高盐环境的离子成分[a]

离子	含量/（g/L）		
	大盐湖[b]	死海	Zugm 湖[c]
Na^+	105	40. 1	142
K^+	6. 7	7. 7	2. 3
Mg^{2+}	11	44	<0. 1
Ca^{2+}	0. 3	17. 2	<0. 1
Cl^-	181	225	155
Br^-	0. 2	5. 3	—
SO_4^{2-}	27	0. 5	23
HCO_3^-	0. 7	0. 2	67
pH	7. 7	6. 1	11

a. 对比海水的组分（g/L）：Na^+，10. 6；K^+，0. 38；Mg^{2+}，1. 27；Ca^{2+}，0. 4；Cl^-，19；Br^-，0. 065；SO_4^{2-}，2. 65；HCO_3^-，0. 14；pH 7. 8。

b. 见图 13. 2a。

c. Wadi EI Natroun，埃及（图 13. 2c）。

由于超盐栖息地化学成分不同，所以筛选出的嗜盐微生物也不同。有的嗜盐菌仅存在于一种环境中，而其他的则分布于几种不同的环境。尽管这些环境都非常严酷，但盐湖仍为高产的生态系统（这里的高产意味着CO_2固定的水平，即自养的水平很高）。古生菌并非是这里唯一的微生物群。真核的藻类——杜氏藻（*Dunaliella*）如果不是唯一的，那也是大多数盐湖中主要的产氧光能生物。在高碱性的碱湖中杜氏藻不生长，外硫红螺菌属（*Ectothiorhodospira*）和需盐红螺菌属（*Halorhodospira*）的厌氧光合紫细菌是主要的类群（见 12. 2 节）。好氧或厌氧的光养生物把初级产物形成有机物，为化能有机营养的极端嗜盐古生菌提供了生长机会。另外，环境里还存在少数极端嗜盐、厌氧的化能有机营养细菌，如盐厌氧菌属（*Haloanaerobium*）和拟盐杆菌属（*Halobacteroides*）。

海盐场（marine saltern）也是极端嗜盐原核生物的栖息地。海盐场是曾注满海水而后又蒸发了的封闭小盆地，含有晒过的海盐（图 13. 2b 和 d）。盐场附近的盐度对极端嗜盐菌来说是生长的低限。嗜盐古生菌的大量生长形成使海水变为红紫色（图 13. 2b

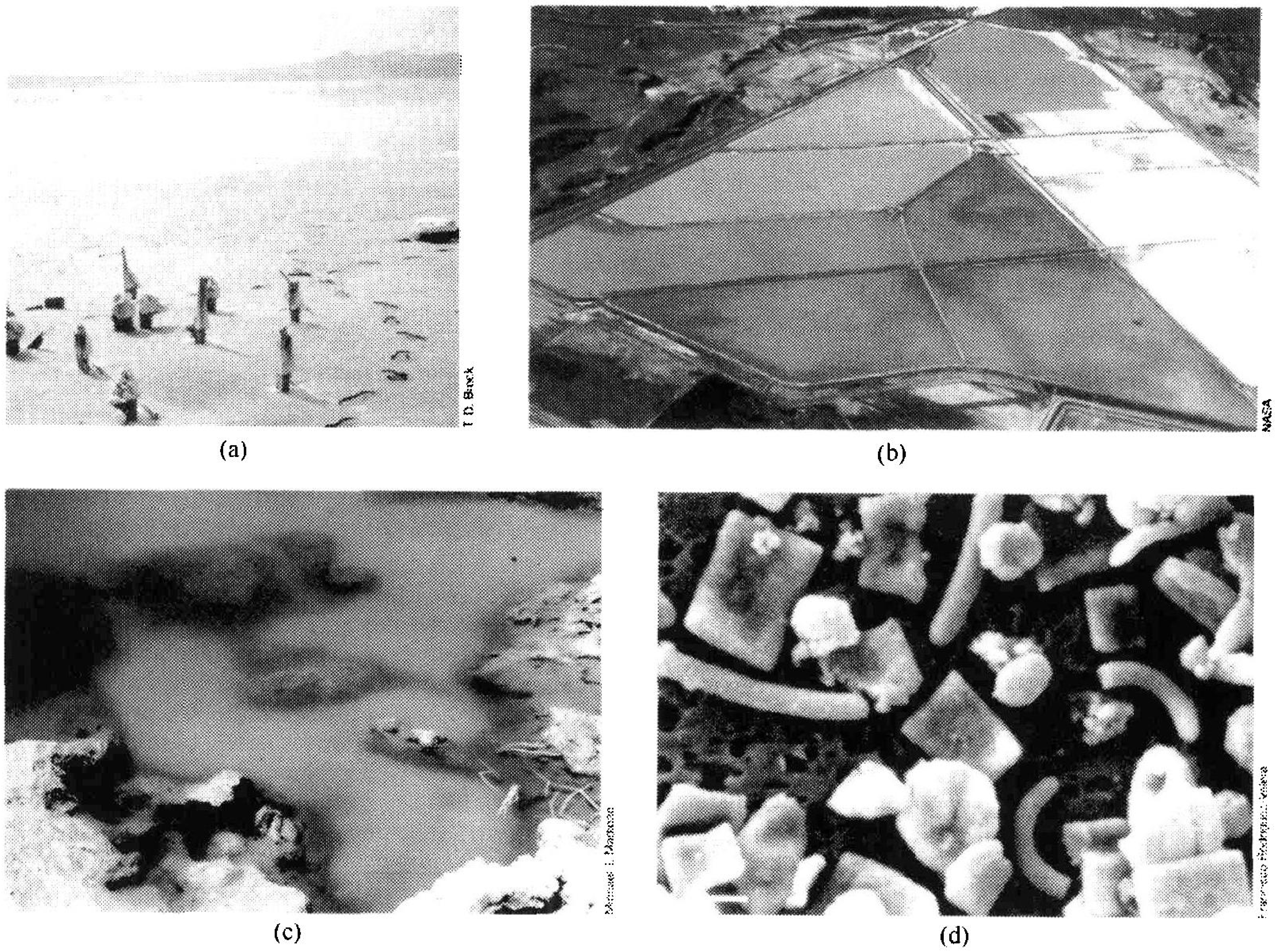


图 13.2　嗜盐古生菌（halophilic *Archaea*）的超盐栖息地。（a）犹他州大盐湖，其湖水离子的比例和海水相似，但离子浓度却要高出海水10倍。绿色表示嗜盐菌绿海藻——盐生杜氏藻（*Dunaliella salina*）的细胞。（b）加州旧金山海湾的鸟瞰图，由于蒸发作用使海水变成盐场，红紫色源于盐杆菌属（*Halobacterium*）细胞内的菌红素和菌紫红质。（c）埃及 Hamara 湖，碱湖的 pH 为 10，生长着许多产色素的嗜盐碱菌（haloalkaliphile）。注意湖的周围是天然碱（$NaHCO_3 \cdot Na_2CO_3 \cdot 2H_2O$）的沉淀物。（d）西班牙盐场嗜盐原核生物的电子扫描图片，有些菌的形态为方形。

和c的红色主要是类胡萝卜素和其他色素，以后详述）。有些具有特殊形态例如方形的古生菌也会出现在盐场（图13.2d）。有些极端嗜盐菌存在于高盐食物中，如腊肠、海鱼和腌猪肉。

极端嗜盐古生菌的分类学及生理学

表13.2列出了极端嗜盐古生菌中已被认可的种，根据16S rRNA基因序列等标准将极端嗜盐菌分为14个属（表13.2）。极端嗜盐古生菌常常被认为是“盐杆菌”（halobacteria），因为盐杆菌属（*Halobacterium*）（图13.3）是这个类群中是最早被描述的属，也是研究最为透彻的属。与其他极端嗜盐菌相比，嗜盐碱杆菌属（*Natronobacterium*）和嗜盐碱单胞菌属（*Natronomonas*）除了嗜盐还能极端嗜碱。嗜盐碱杆菌栖息于碱湖（表13.1和图13.2c），其最适生长条件为极低浓度的 Mg^{2+} 和高 pH（pH9～pH11）。

表 13.2 极端嗜盐古生菌的一些属

属名	形态	DNA/(mol%GC)	生长环境
极端嗜盐菌（Extreme halophile）			
盐杆菌属（*Halobacterium*）	杆状	66～71	咸鱼、皮革、高盐湖、盐场
盐红菌属（*Halorubrum*）	杆状	62～71	死海、盐场
盐棒菌属（*Halobaculum*）	杆状	70	死海
富盐菌属（*Haloferax*）	扁平盘状	60～66	死海、盐场
盐盒菌属（*Haloarcula*）	不规则盘状	63～65	盐池、死谷、海盐场
盐球菌属（*Halococcus*）	球形	59～66	咸鱼、盐场
盐立体菌属（*Halogeometricum*）	杆状	59～60	晒盐场
盐陆生菌属（*Haloterrigena*）	杆状，卵形	59～60	盐渍土
嗜盐碱菌（Haloalkaliphile）			
嗜盐碱杆菌属（*Natronobacterium*）	杆状	65	高盐碱湖
钠线菌属（*Natrinema*）	杆状	70	咸鱼、皮革
无色嗜盐菌属（*Natrialba*）	杆状	60～63	碱湖、沙滩
嗜盐碱单胞菌属（*Natronomonas*）	杆状	61～64	碱湖
嗜盐碱球菌属（*Natronococcus*）	球形	63～64	碱湖
嗜盐碱红菌属（*Natronorubrum*）	扁平细胞	59～60	碱湖

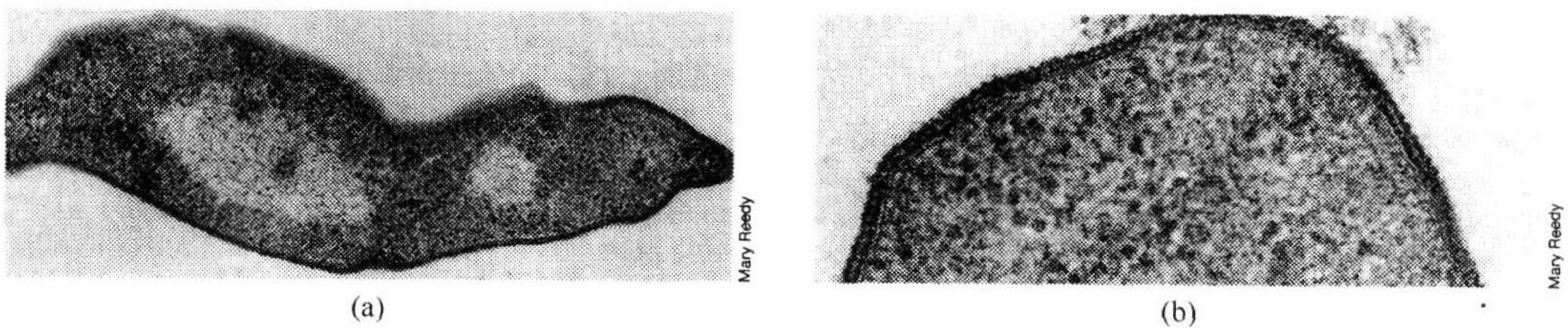


图 13.3 极端嗜盐菌——盐沼盐杆菌（*Halobacterium salinarum*）薄切片的电镜显微照片。细胞直径约 0.8 μm。(a) 分裂期细胞纵切，显示拟核结构。(b) 高放大倍数电子显微镜照片显示出细胞壁的糖蛋白亚基。

极端嗜盐古生菌均为革兰氏阴性、二分裂繁殖、无休眠状态、不产孢子。大多数嗜盐菌不运动，但有少数种以丛生鞭毛缓慢运动或通过气泡漂浮。盐杆菌属和盐球菌属的基因组成非常独特，质粒 DNA 占细胞总 DNA 的 25%～30%，并且这些大质粒的 GC 碱基比率（57%～60%）与染色体 DNA 的 GC 的比率（66%～68%）有明显的差异。极端嗜盐菌的质粒与其他已知的质粒没有什么区别（见 10.9 节）。

大多数极端嗜盐古生菌为专性好氧，以氨基酸或有机酸为能源，并且需要一定的生长因子（主要是维生素）。少数嗜盐杆菌能氧化碳水化合物，但利用能力相对要弱。嗜盐杆菌的电子传递链包括细胞色素 a、b 和 c，在好氧生长时通过内膜介导的化学渗透过程所引发的质子动力来储存能量。一些嗜盐古生菌的菌株可以进行厌氧生长。某些菌株的厌氧生长是通过耗糖发酵，硝酸盐或延胡索酸的无氧呼吸来进行的（见 17.13 节）。

极端嗜盐菌的水分平衡

极端嗜盐古生菌生长需要大量的 Na^+。盐杆菌属对盐分的吸收已被深入研究，其对 Na^+ 的需求非常独特，其他任何离子包括化学性质相近的 K^+ 都无法代替。然而，盐杆菌属细胞的生长则需要 Na^+ 和 K^+，两种离子在保持盐分平衡方面都起着重要作用。

如 6.14 节所讲，微生物需要抵抗盐的渗透力以适应环境。为了在高盐环境中生存（如盐杆菌属栖息于富含 NaCl 的环境），机体细胞需要在胞内合成或积累溶质。这种溶质被称为相容性溶质（compatible solute）。在高渗透压下，这些化合物可使细胞与其周围环境保持水分平衡以防止细胞脱水（见 6.14 节）。然而，盐杆菌属细胞并不合成有机物，而是从环境中泵入大量 K^+ 进入细胞质，这样可使胞内的 K^+ 浓度远远高于胞外 Na^+ 的浓度（表 13.3），从而维持渗透压平衡。

表 13.3　盐沼盐杆菌细胞内的离子浓度

离子	培养基中的浓度/（mol/L）	细胞内的浓度/（mol/L）
Na^+	3.3	0.8
K^+	0.05	5.3
Mg^{2+}	0.13	0.12
Cl^-	3.3	3.3

盐杆菌的细胞壁（图 13.3b）由糖蛋白组成，并依靠 Na^+ 来稳定。Na^+ 结合于细胞壁的外表面，对维持细胞的完整性非常重要。当 Na^+ 不足时，细胞壁会破碎并使细胞裂解，这是盐杆菌细胞壁的糖蛋白含有大量酸性氨基酸（带负电荷）——天冬氨酸和谷氨酸（图 3.12）的结果。这些氨基酸所带的负电荷被 Na^+ 屏蔽，当 Na^+ 被稀释掉后，蛋白质的负电荷区互相排斥，最终导致细胞裂解。

嗜盐菌的细胞质组分

与细胞壁蛋白相似，盐杆菌的细胞质蛋白也为高酸性，然而 K^+ 对其活性是必需的，而不是 Na^+。也就是说，在盐杆菌细胞中，K^+ 是胞内的主要阳离子（表 13.3）。除了含有酸性氨基酸外，与那些非嗜盐菌相比，盐杆菌细胞质蛋白典型地含有很少量的亲水性（hydrophobic）氨基酸和赖氨酸（一种基本氨基酸）。因为在高离子环境中，极性的蛋白质可继续成为溶解状态，而非极性分子则趋向于成簇并失去活性。盐杆菌的核糖体也以高浓度的 K^+ 来保持其稳定性，而非嗜盐菌的核糖体则不需要 K^+。

这样，极端嗜盐古生菌的胞内和胞外都足以使它适应高离子浓度的环境。为了稳定，暴露于外环境的细胞成分需要高浓度的 Na^+，而胞内成分则需要高浓度 K^+。除了细菌中一些极端嗜盐菌外，我们尚未发现其他类群的原核生物也这样需要如此大量的特异性阳离子。

盐杆菌的菌紫红质与光介导的 ATP 合成

有些极端嗜盐古生菌具有光驱动的 ATP 合成过程。这一过程不属于光合作用，因

为没有叶绿素参加，但涉及其他对光敏感的色素，如红色和橙色的类胡萝卜素——被称为菌红素（bacterioruberin）的原 C_{50} 色素及能量代谢中的一些可诱导色素。

在低氧条件下，盐沼盐杆菌（*Halobacterium salinarum*）和其他一些极端嗜盐菌合成一种称为菌紫红质（bacteriorhodopsin）的蛋白质，并将它嵌入细胞膜中。由于菌紫红质与眼睛的视觉色素——视紫红质（rhodopsin）具有相似的结构和功能而得名。与菌紫红质结合的是一个视黄醛（retinal）分子，其与类胡萝卜素相似，能够吸收光并催化质子动力形成（图 13.4）。视黄醛使得菌紫红质具有紫色，当盐杆菌细胞从高氧的环境转到限氧的条件下生长时（这一过程可激发菌紫红质合成），由于合成了菌紫红质并插入到细胞质膜中，细胞的颜色由橙色或红色慢慢变得更红更紫。

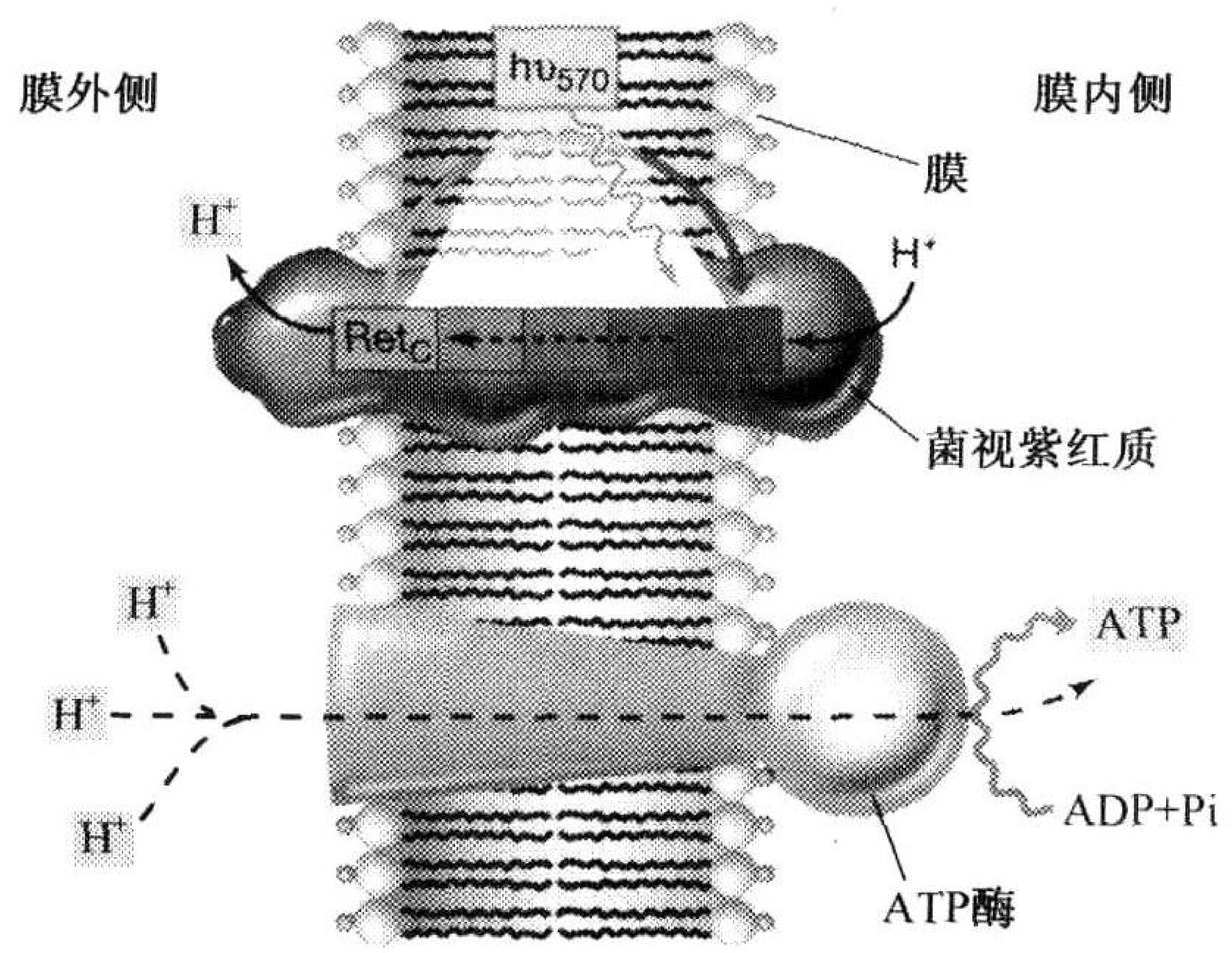


图 13.4 菌紫红质作用的机制模型。570nm（$h\upsilon_{570}$）附近的光使菌紫红质的质子化视黄醛由反式（Ret_T）变为顺式（Ret_C），伴随着这一过程一个质子迁移到膜外，这样形成质子动力，驱动 ATP 酶作用（见 5.12 节）。

菌紫红质吸收可见光光谱的绿光区（大约 570nm）。菌紫红质的视黄醛通常以全反式（all-trans）结构存在，伴随着光吸收，视黄醛被激发并转换成顺式（cis）结构（图 13.4）。这种转型作用的结果使质子转移到膜的外表面。接着，视黄醛分子在黑暗中吸收细胞质的一个质子转换成更为稳定的全反式异构体，从而完成循环（图 13.4）。随着质子在膜的外表面积累，质子动力增加（见 5.12 节），直到膜的“充电”已经足够到可以驱动结合在膜上的 ATP 酶活性，从而进行 ATP 的合成（图 13.4）。

在盐沼盐杆菌中，光介导的 ATP 合成可维持其在厌氧条件下低速生长。光激发的质子泵也具有通过 Na^+/H^+ 反向转运系统向细胞外泵出 Na^+ 的功能（见 4.6 节），并驱动包括各种营养物的吸收，包括为保持渗透平衡所需要的 K^+。盐沼盐杆菌对氨基酸的吸收被证明是间接地通过光来驱动的，因为氨基酸的运载与 Na^+ 的吸收是通过一种氨基酸-Na^+ 同向运输系统来进行的（见 4.6 节）。若要继续吸收氨基酸，则需要通过光驱动的 Na^+/H^+ 反向转运系统移除 Na^+。

其他的视紫红质

除了菌紫红质，至少还有 3 种视紫红质存在于盐沼盐杆菌的膜中。盐细菌视紫红质（halorhodopsin）是一种光驱动泵，其可将 Cl^- 泵进细胞以平衡 K^+。盐细菌视紫红质的视黄醛结合 Cl^- 并将其移入胞内。盐沼盐杆菌有两种光敏感元件，称为传感器视紫红质（sensory rhodopsin）。这些光敏感元件控制细胞的趋光性（向光的方向移动，见 4.16 节）。通过一系列类似于趋化性（见 4.16 节和 8.13 节）蛋白质的相互作用，传感器视紫红质影响鞭毛的旋转，使盐沼盐杆菌细胞移向有光的地方，从而使菌紫红质行使作用生成 ATP（图 13.4）。

下面我们讨论开放性海洋细菌（见 19.6 节）的类菌紫红质蛋白——变形菌视紫质

(proteorhodopsin)。目前已知，变形菌视紫质和菌紫红质功能相似，但其存在几种不同的光谱结构，每一种负责吸收不同波长的光。由于海洋中有机物的浓度非常低（见 19.6 节），专性化能有机营养生命很难生存，因此，变形菌视紫质作为海洋原核生物的一种能量代谢机制有重要的生态学意义。

概念检查

极端嗜盐古生菌的生长需要大量的 NaCl。这些生物体在其细胞质内积累了大量的 KCl 作为相容性溶质。这些盐分会影响细胞壁的稳定性和酶活性。极端嗜盐菌的菌紫红质利用光介导的质子泵产生 ATP。

◆ 盐杆菌属和嗜盐碱杆菌属的主要生理区别是什么？

◆ 盐杆菌属细胞需要大量 Na^+，为什么其细胞质的酶不需要大量 Na^+（表 13.3)？

◆ 菌紫红质对盐沼盐杆菌细胞有何益处？盐细菌视紫红质对盐沼盐杆菌细胞有何用途？

13.4 产甲烷古生菌：产甲烷菌

主要属：甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）、甲烷嗜温球菌属（*Methanocaldococcus*）、甲烷八叠球菌属（*Methanosarcina*）

许多广古生菌所产生的甲烷（CH_4）是其能量代谢不可缺少的部分。这些能产甲烷的生物被称为产甲烷菌（methanogen)，甲烷形成的过程被称为产甲烷作用（methanogenesis)。意大利物理学家 Alessandro Volta 最早发现甲烷并将其称为“易燃的空气”，他从沼泽的沉积物中收集气体并证实其可燃性。这个实验就是众所周知的 Volta 实验（Volta experiment)，如果能从淡水沉淀里收集甲烷并小心点燃，Volta 实验就很容易重复（图 13.5)。

在后面的章节中，我们将介绍甲烷形成的复杂过程及其生化特性（见 17.17 节)。此外，我们将介绍在许多缺氧的自然环境中（如图 13.5 所示的沼泽)，产甲烷作用为什么是有机物代谢的最终步骤（见 19.10 节)。表 13.4 列出了生物产甲烷的天然源地。

表 13.4　产甲烷菌的栖息地

栖息地
Ⅰ. 缺氧的沉淀
湿地、沼泽（图 13.5)、湖中沉淀、稻谷田地、潮湿的垃圾站（见 19.10 节)
Ⅱ. 动物的消化道
(a) 牛、羊、麋鹿、鹿以及骆驼等反刍动物的瘤胃（见 19.11 节)
(b) 马、兔等草食动物的盲肠（见 19.11 节)
(c) 人、猪、狗等单胃动物的大肠（见 21.4 节)
(d) 溶纤维昆虫的后肠（如白蚁)
Ⅲ. 氢气和二氧化碳的地热源：热水流火山口（见 19.8 节)
Ⅳ. 人工降解设备：处理淤泥的下水道（见 28.2 节)
Ⅴ. 各种厌氧原生动物的内共生体（图 19.26)



图 13.5 微生物多样性暑期班课上，在马塞诸塞州的森林洞穴里展示 Volta 实验。从森林洞穴的淡水沼泽里取出含厌氧降解物的沉淀，用一个大漏斗倒置在沉淀上。用水将漏斗的空气排尽后封住口，玻璃棒搅拌沉淀使其产生气泡并用漏斗收集气泡。瞬间解开漏斗的封口并将火焰置于漏斗口旁，这样甲烷就被点燃。这个实验在 200 多年前曾由 Alessandro Volta 演示，因此他将甲烷称为“易燃的空气”。

产甲烷菌的多样性和生理学

产甲烷菌的形态多种多样（图 13.6 和表 13.5）。基于表型和系统发育分析（表 13.5），已经在分类学上确认了产甲烷菌的几个“目”（在分类学上，一个“目”包含几个相关的“科”，每个“科”又含有一个或几个“属”；表 11.6）。

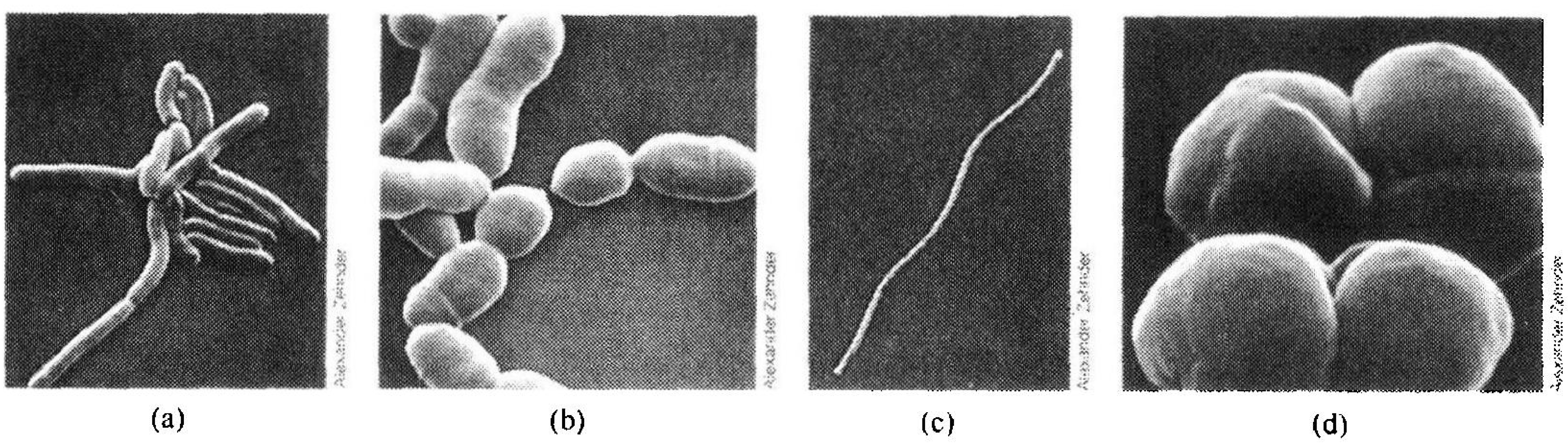


图 13.6 各种产甲烷古生菌的电镜照片，显示了产甲烷菌形态的多样性。（a）瘤胃甲烷短杆菌（*Methanobrevibacter ruminantium*），细胞直径约为 0.7μm。（b）嗜树甲烷短杆菌（*Methanobrevibacter arboriphilus*），细胞直径约为1μm。（c）亨氏甲烷螺菌（*Methanospirillum hungatii*），细胞直径约为 0.4μm。（d）巴氏甲烷八叠球菌（*Methanosarcina barkeri*），细胞直径约为 1.7μm。

表 13.5　部分产甲烷古生菌的特征[a]

属	形态	产甲烷的底物	DNA/(mol%GC)
甲烷杆菌目（Methanobacteriales）			
甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）	长杆	H_2+CO_2、甲酸盐	30～55
甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）	短杆	H_2+CO_2、甲酸盐	27～31
甲烷球形菌属（*Methanosphaera*）	球形	甲醇$+H_2$（两者均需）	23～26
甲烷嗜热菌属（*Methanothermus*）	杆状	H_2+CO_2；也能还原S^0；超嗜热	33
甲烷嗜热杆菌属（*Methanothermobacter*）	杆状	H_2+CO_2、甲酸盐；嗜热	32～61
甲烷球菌目（Methanococcales）			
甲烷球菌属（*Methanococcus*）	不规则球状	H_2+CO_2、丙酮酸$+CO_2$、甲酸盐	29～35
甲烷嗜热球菌属（*Methanothermococcus*）	球形	H_2+CO_2、甲酸盐	31～34
甲烷嗜温球菌属（*Methanocaldococcus*）	球形	H_2+CO_2	31～33
甲烷炎菌属（*Methanotorris*）	球形	H_2+CO_2	31
甲烷微菌目（Methanomicrobiales）			
甲烷微菌属（*Methanomicrobium*）	短杆	H_2+CO_2、甲酸盐	49
产甲烷菌属（*Methanogenium*）	不规则球形	H_2+CO_2、甲酸盐	47～52
甲烷螺菌属（*Methanospirillum*）	螺旋状	H_2+CO_2、甲酸盐	45～50
甲烷盘菌属（*Methanoplanus*）	边缘整齐的薄盘状细胞	H_2+CO_2、甲酸盐	39～50
甲烷粒菌属（*Methanocorpusculum*）	不规则球形	H_2+CO_2、甲酸盐、乙醇	48～52
甲烷袋状菌属（*Methanoculleus*）	不规则球形	H_2+CO_2、乙醇、甲酸盐	49～61
甲烷泡菌属（*Methanofollis*）	不规则球形	H_2+CO_2、甲酸盐	54～60
叶形甲烷菌属（*Methanolacinia*）	不规则杆状	H_2+CO_2、乙醇	38～45
甲烷八叠球菌目（Methanosarcinales）			
甲烷八叠球菌属（*Methanosarcina*）	包裹状不规则球形	H_2+CO_2、甲醇、甲基胺类、乙酸盐	36～43
甲烷叶菌属（*Methanolobus*）	不规则球菌聚在一起	甲醇、甲基胺类	39～46
甲烷盐菌属（*Methanohalobium*）	不规则球状	甲醇、甲基胺类；嗜盐	37
拟甲烷球菌属（*Methanococcoides*）	不规则球状	甲醇、甲基胺类	42
甲烷嗜盐菌属（*Methanohalophilus*）	不规则球状	甲醇、甲基胺类、甲基硫化物；嗜盐	39～41
鬃毛甲烷菌属（*Methanosaeta*）	灯丝长杆状	醋酸盐	52～61
甲烷盐菌属（*Methanosalsum*）	不规则球状	甲醇、甲基胺类、二甲基硫化物	38～40
甲烷火菌目（Methanopyrales）			
甲烷火菌属（*Methanopyrus*）	链杆状	H_2+CO_2；超嗜热，生长在110℃	60

a. 分类学上的“目”用黑体表示。

产甲烷菌细胞壁的成分多种多样。其中甲烷杆菌属为假肽聚糖（pseudopeptidoglycan）壁（图 13.7a）、甲烷八叠球菌属（*Methanosarcina*）为甲烷软骨素（mathano-

chondroitin）壁（因其结构与脊椎动物的连接组织聚合体——软骨素相似而得名）（图 13.7b）、甲烷嗜温球菌属和甲烷盘菌属（*Methanoplanus*）是蛋白或糖蛋白壁（图 13.8a）、甲烷螺菌属（*Methanospirillum*）是表面层蛋白（S-layer）壁（图 13.6，见 4.8 节）。

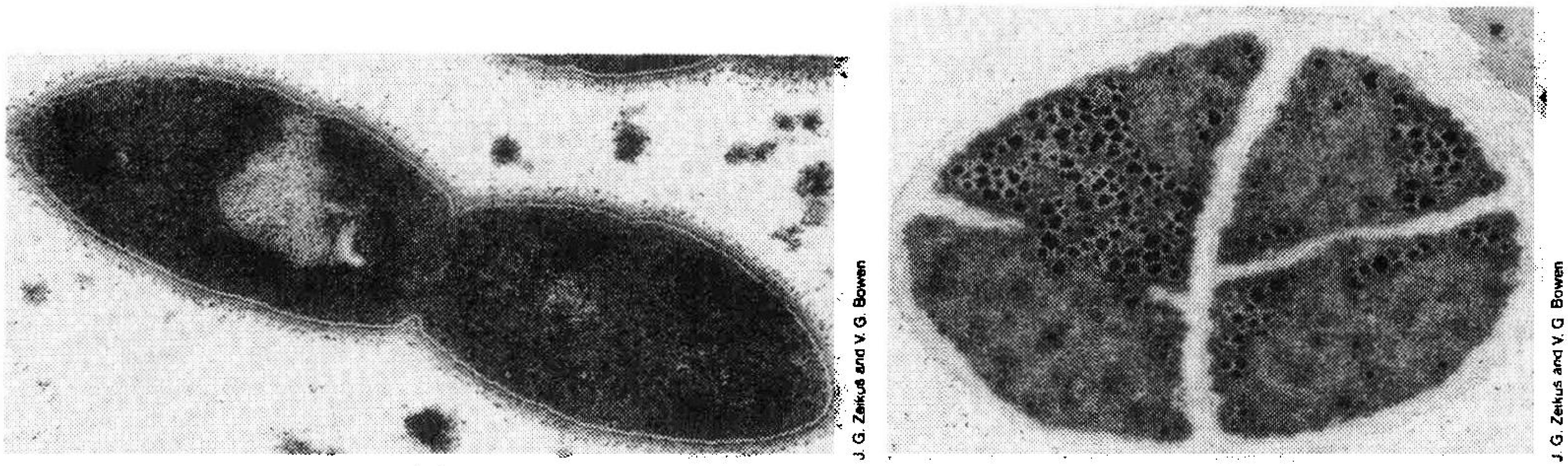


图 13.7　产甲烷古生菌薄切片的透射电镜照片。（a）瘤胃甲烷短杆菌（*Methanobrevibacter ruminantium*），细胞直径约为 0.7μm。（b）巴氏甲烷八叠球菌（*Methanosarcina barkeri*），显示薄薄的细胞壁以及细胞分裂和横壁形成的方式，细胞直径约为 1.7μm。瘤胃甲烷短杆菌的细胞壁含假肽聚糖（图 4.33a），而巴氏甲烷八叠球菌的细胞壁由蛋白质和多聚糖组成。

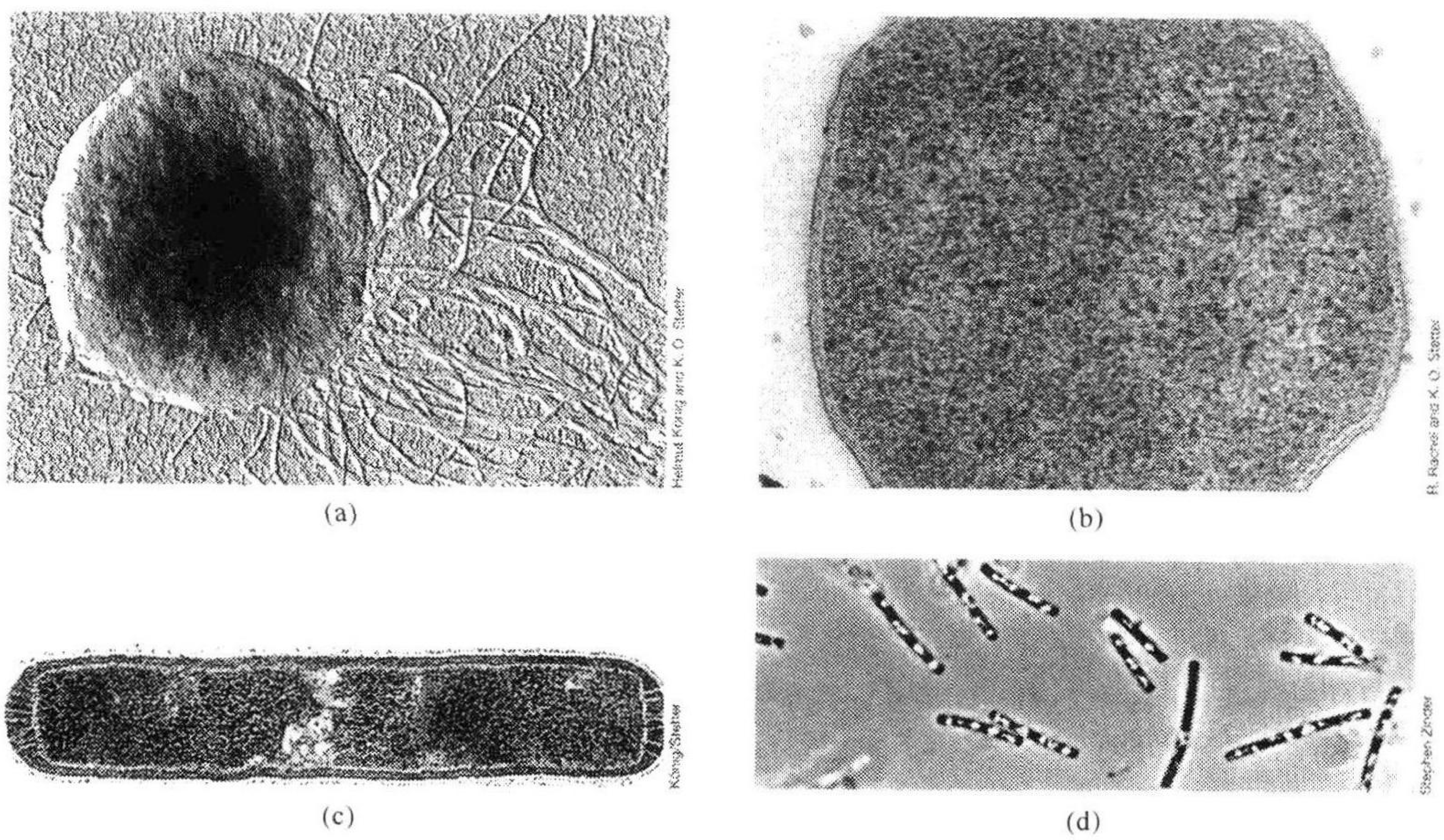


图 13.8　超嗜热和嗜热的产甲烷菌。（a）詹氏甲烷嗜温球菌（*Methanocaldcoccus jannaschii*）（最适生长温度 85℃）的电镜照片，细胞直径约为 1μm。（b）火源甲烷球菌的薄切片照片（*Methanococcus igneus*）（最适生长温度 88℃），细胞直径约为 1μm。（c）炽热甲烷嗜热菌（*Methanothermus fervidus*）（最适生长温度 88℃）的薄切片电镜照片，细胞直径约为 0.4μm。（d）嗜热鬃毛甲烷菌（*Methanosaeta thermophila*）（最适生长温度 60℃）相差显微镜照片，细胞直径约为 1μm，细胞内的折光体是气泡（见 4.12 节）。

生理上，产甲烷菌是专性厌氧的，因此需要严格的厌氧技术来培养产甲烷菌。将产甲烷菌接种在无机盐培养基或合成培养基上，并根据不同的种，置于含不同比例的 H_2 和 CO_2 空气下培养（一般比例为 4∶1，反应见后）。尽管这些“嗜极”微生物适合生长在如前文所述的极高、极低温度或高盐环境（图 13.8 和图 13.13），然而目前已知的产甲烷菌大多是嗜温的（mesophilic）和非嗜盐的（nonhalophilic）生物。

产生甲烷的底物

已知至少有 11 种底物可通过产甲烷菌的纯培养转化成甲烷（表 13.6）。有趣的是，这些底物并不包括普通的化合物如葡萄糖、有机酸或脂肪酸（但不是醋酸盐和丙酮酸）等。葡萄糖等化合物可被转化成甲烷，但需要产甲烷菌和其他厌氧细菌的共同作用。实际上，任何有机物甚至氢碳化合物经过合适的混合培养，都可被转化成甲烷和 CO_2（见 19.10 节）。

表 13.6　各种甲烷古生菌的产甲烷底物

Ⅰ. CO_2 型底物
二氧化碳（CO_2）（从 H_2、某些醇类或丙酮酸获得电子）
甲酸（$HCOO^-$）
一氧化碳（CO）
Ⅱ. 甲基类底物
甲醇（CH_3OH）
甲基胺（$CH_3NH_3^+$）
二甲基胺[$(CH_3)_2NH_2^+$]
三甲基胺[$(CH_3)_3NH^+$]
巯甲基（CH_3SH）
二甲基硫[$(CH_3)_2S$]
Ⅲ. 乙酸型底物
乙酸（CH_3COO^-）
丙酮酸（CH_3COCOO^-）

如表 13.6 所述，产甲烷底物有 3 类，包括 CO_2 型底物、甲基类底物和乙酸型底物。CO_2 型底物包括 CO_2 本身，其以 H_2 为电子供体被还原成甲烷：

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \quad \Delta G^{0'} = -131kJ$$

此类其他的底物包括甲酸盐（大多仅以 $CO_2 + H_2$ 的结合形式）和一氧化碳（CO）。

第二类产甲烷底物，即甲基类底物（表 13.6）。甲醇是甲基类底物的典型代表，甲烷的形成可通过两种方式。第一，甲醇通过外源的电子供体 H_2 等被还原：

$$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \quad \Delta G^{0'} = -113kJ$$

而在没有 H_2 的情况下，一些甲醇（CH_3OH）可被氧化成 CO_2，这一过程产生的电子用于把其他的 CH_3OH 分子还原成 CH_4：

$$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O \quad \Delta G^{0'} = -319kJ$$

第三类甲烷底物是乙酸型底物，乙酸裂解成 CH_4 和 CO_2，称为乙酸型反应（acetotrophic reaction）：

$$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- \quad \Delta G^{0'} = -31kJ$$

只有很少的产甲烷菌使用乙酸型底物（表 13.5）。然而，通过对产甲烷菌的栖息地如下水道淤泥的估计显示，大约 2/3 的甲烷来源于乙酸盐，1/3 来源于 $H_2 + CO_2$。因此，尽管没有发现乙酸型产甲烷菌的多样性，但其对生态也十分重要。

从上面的反应可以看出，每个反应都释放能量，因此可用来合成 ATP。在第 17 章将详细介绍产甲烷作用的生化过程。这里我们注意，产甲烷作用可通过化学渗透机制与质子动力的形成，以及与 ATP 的合成相偶联（见 5.12 节）。产甲烷作用中不存在细菌发酵过程中的底物水平磷酸化。

典型的产甲烷古生菌——詹氏甲烷嗜温球菌

在 15.3 节中已经介绍过，超嗜热的詹氏甲烷嗜温球菌（*Methanocaldococcus jannaschii*）和其他几种产甲烷菌的基因组已被测序（图 13.8a）。詹氏甲烷嗜温球菌的基因组呈环状，大小为 1.66 Mb，包括 1700 个基因。通过序列分析，已经确定了与产甲烷作用以及细胞关键功能相关的几种酶，这些酶都由基因编码。有趣的是，大多数编码中心代谢途径和细胞分裂的基因与细菌的基因很相似。相反，编码转录和翻译过程关键大分子的基因却与真核生物的基因很相似。这一发现可从系统进化树上找到原因，在进化树上，古生菌域位于细菌域和真核生物域之间（见 11.8 节和图 11.13）。然而，通过对詹氏甲烷嗜温球菌基因组的分析发现，近 50%基因组与任何已知生物的基因没有相似性。这说明古生菌 DNA 编码的很多新的细胞功能还没被发现，或者很多已知的功能是由冗余（并且很不相同）的基因所编码。

概念检查

产甲烷古生菌是严格厌氧的原核生物，其代谢与产甲烷（CH_4）相关。

◆ Volta 实验说明了什么？

◆ 甲烷产生的主要底物有哪些？

13.5 热原体目：热原体属、铁原体属和嗜酸菌属

代表属：热原体属（*Thermoplasma*）、嗜酸菌属（*Picrophilus*）、铁原体属（*Ferroplasma*）

古生菌的不同系统发育包括了 3 种嗜热和极端嗜酸的原核生物：热原体属、铁原体属和嗜酸菌属（图 13.1），它们属于广古生菌门的热原体目（Thermoplasmatales），是已知的最嗜酸的微生物，如嗜酸菌属可在 pH 0 以下的环境中生长。下面我们先从与支原体相似的热原体属和铁原体属进行描述。

无细胞壁的古生菌

热原体属和铁原体属没有细胞壁，这一点类似于支原体（见 12.21 节）。热原体属（图 13.9a）属于化能有机营养型，其最适生长于 55℃、pH 2 的合成培养基中。热原体

属的两个种——嗜酸热原体（*Thermoplasma acidophilum*）和火山热原体（*Thermoplasma volcanium*）已被详细描述。它们一般为兼性好氧，通过硫呼吸作用进行好氧或厌氧生长。热原体属的很多菌株是从自身发热的煤垃圾堆中分离的（图 13.10），煤垃圾堆含有煤渣、黄铁矿（FeS_2）及煤浸出的有机物。开采煤矿时形成垃圾堆，通过自发燃烧形成自发热（图 13.10），这就为热原体的生长提供了条件。而热原体通常是将从热煤堆中滤出的有机物作为营养进行代谢。热原体属的第二个种——火山热原体是从世界各地的热酸性土壤中分离得到的，其生有多根鞭毛因而运动性很强（图 13.9b）。

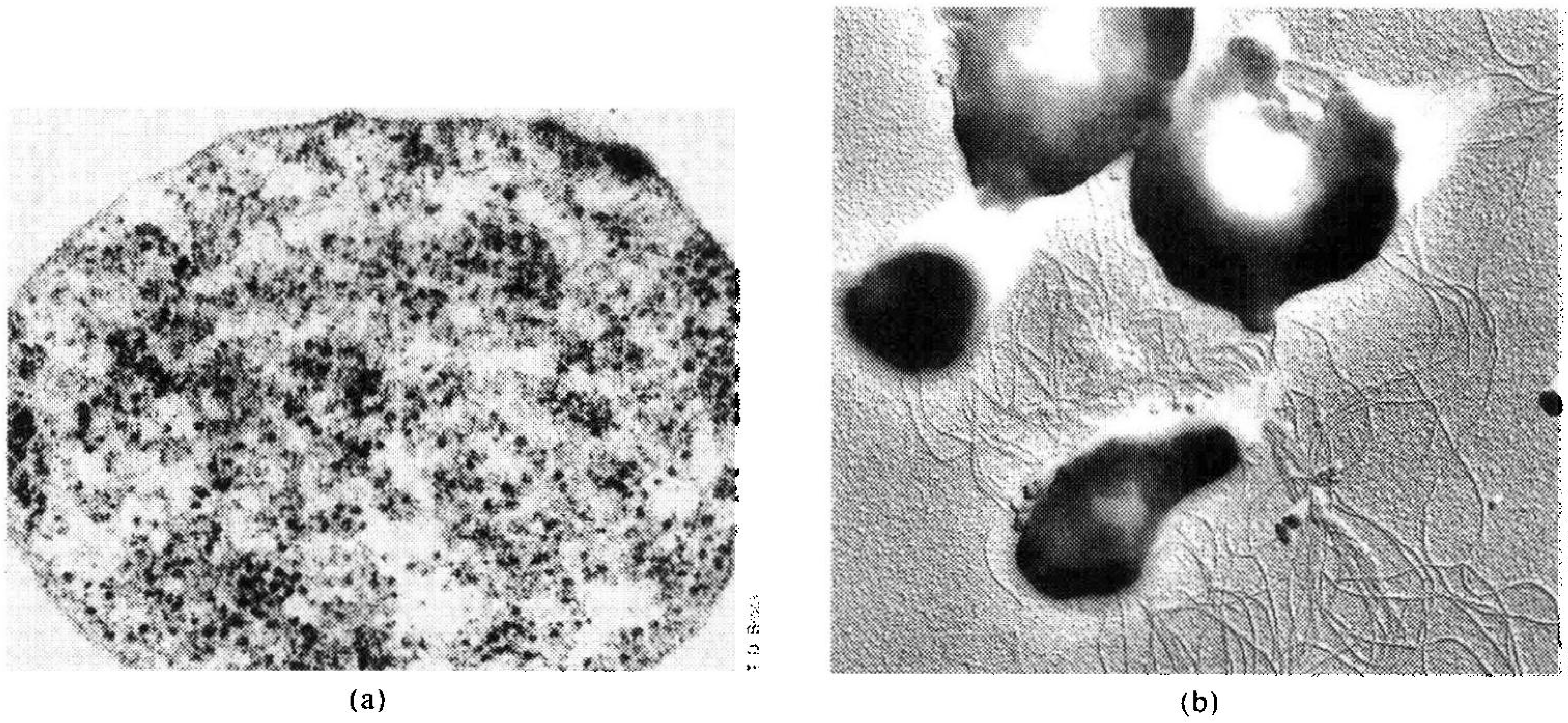


图 13.9　热原体属的种。（a）嗜酸热原体。一种嗜酸、嗜热的古生菌，类似于支原体。薄切片电镜照片，细胞直径变化很大，为 0.2～5μm，图示的细胞直径约为 1μm。（b）从热泉分离、喷涂制备的火山热原体，细胞直径为 1～2μm，注意生有多根鞭毛。

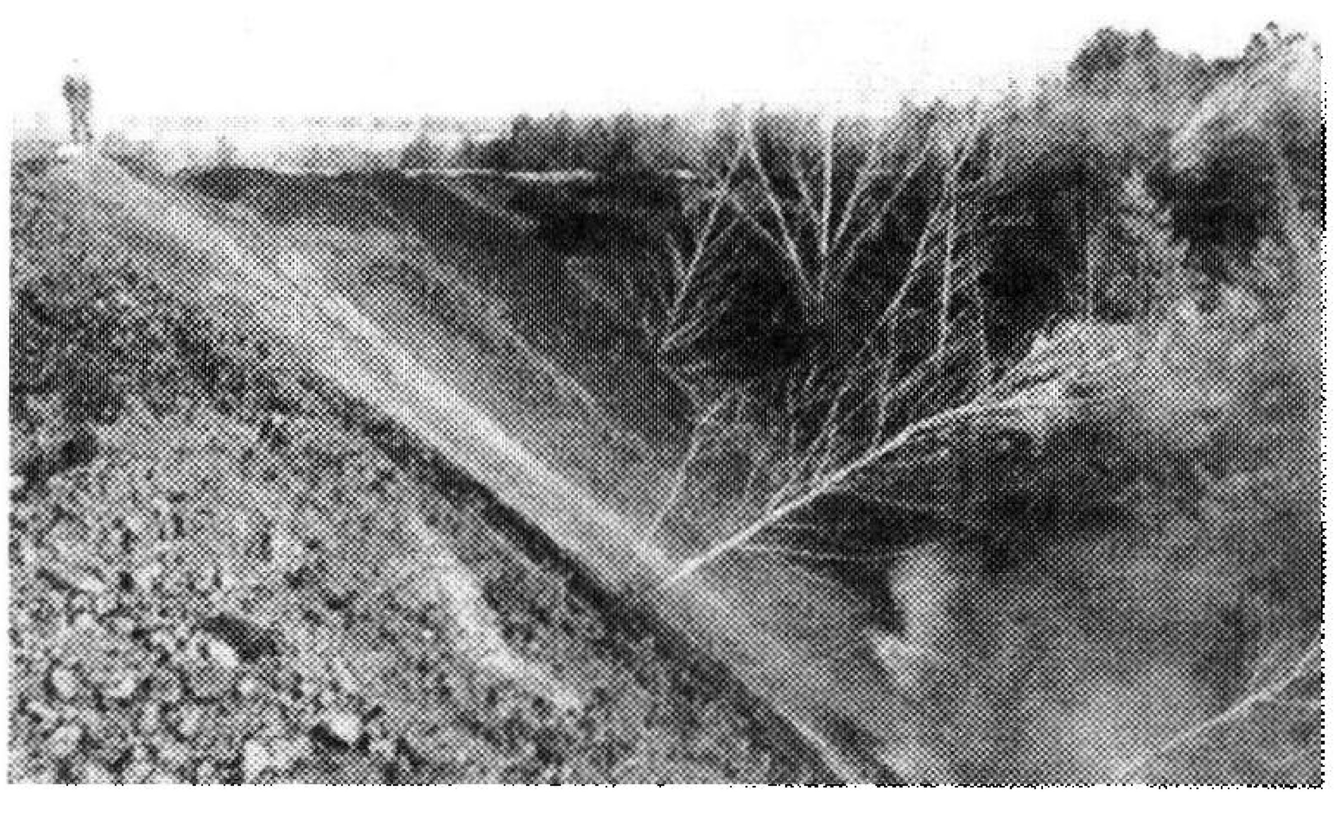


图 13.10　热原体属栖息的、典型的、自燃的煤垃圾堆。煤垃圾堆含有煤渣、黄铁矿以及其他的微生物底物，自燃源于微生物代谢。

在无细胞壁条件下，为了抵御渗透压，以及适应极低 pH 和高温等极端环境，热原体进化出一种独特的细胞膜结构。这种质膜含有一种类似脂多糖（lipopolysaccharide）的物质——脂聚糖（lipoglycan）（见 12.21 节）。脂聚糖由四醚（tetraether）类脂单层膜组成，膜上有甘露糖和葡萄糖（图 13.11）。这种分子组成了热原体属所有脂类的主要片段。质膜还含有糖蛋白，但是没有固醇类物质。这些分子使得热原体属的细胞膜在

高温、酸性条件下具有稳定性。

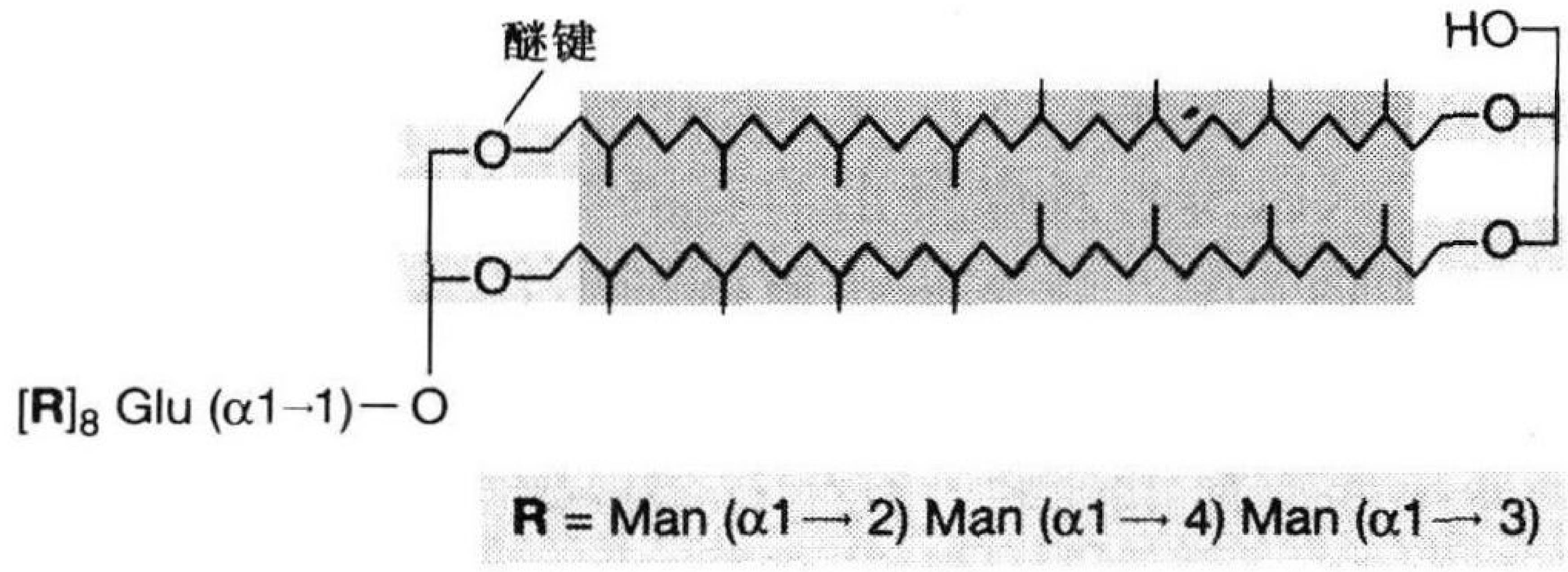


图 13.11　嗜酸热原体的四醚脂聚糖结构。Glu：葡萄糖；Man：甘露糖。注意醚键（以绿色显示），这种类脂形成单层膜而不是双层膜（比较图 4.19b）。

热原体属的基因组非常有趣。像支原体一样（见 12.21 节和 15.3 节），热原体属的基因组很小（1.5Mb）。另外，热原体属 DNA 与一种 DNA 结合蛋白质作用，形成类似真核细胞核小体的球状微粒（见 7.3 节真核生物 DNA 排列的讨论）。这种蛋白质与真核细胞的组蛋白有同源性。类似的组蛋白在其他的广古生菌中也曾发现过（见 13.12 节）。

铁原体属

铁原体属为化能无机营养型，与热源体属的亲缘关系较近。铁原体属的嗜酸性很强，但其并不嗜热，最适生长温度为 35℃。铁原体属（图 19.35）将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}（这一过程产酸，见 19.14 节和图 13.15d）而获得能量并以 CO_2 为碳源（自养型）。

铁原体属生长于含黄铁矿（FeS）的矿石堆里，以黄铁矿为能量来源。铁原体属的极端嗜酸性使它能够将栖息地的 pH 降低，变为极端酸性环境。氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）和铁氧化钩端螺菌（*Leptospirillum ferrooxidans*）等嗜酸微生物可氧化 Fe^{2+} 形成适度的酸性，然后铁原体属被激活并使 pH 更低，从而使消耗酸矿石。铁原体属的活动可把酸水的 pH 降到 0（见 19.14 节和 19.15 节及图 19.35）。

嗜酸菌属

嗜酸菌属与热原体属和铁原体属的系统发育相近。热原体属和铁原体属都极端嗜酸，然而嗜酸菌属的嗜酸性更强，其最适的生长环境是 pH 0.7，并能在 pH 为 −0.06 的环境下生长！嗜酸菌属有细胞壁结构（表面层蛋白 S-layer，见 4.10 节），其 DNA 的 GC 百分率比热原体属和铁原体属更低。因此，尽管热原体属、铁原体属和嗜酸菌属有着相同的系统发育地位，其基因组却很不相同。从日本的硫磺热泉（solfatara）中分离出了嗜酸菌属的两个种，其与热原体属相似，在合成培养基上以异养方式生长。

嗜酸菌属的生理学可作为耐受极端酸性的模式。通过研究其细胞膜，发现其类脂的排列很不寻常，能形成一种在最适 pH 下不被强酸透过的膜。相反，在一般的酸性条件如 pH 4 的时候，嗜酸菌属的细胞膜变得渗漏且不完整。很明显，这种生物由于进化选择只能在高酸性条件下生存。

概念检查

热原体属、铁原体属和嗜酸菌属是极端嗜酸嗜热菌，它们在古生菌系统发育中形成热原体目，栖息于煤垃圾堆和强酸的硫磺热泉。热原体属和铁原体属的细胞没有细胞壁，在这一点上与支原体很相似。

- 热原体属和嗜酸菌属的哪些方面相同，哪些方面不同？
- 热原体属是如何增强其细胞膜从而能在没有细胞壁的情况下生存的？
- 铁原体属是如何获得能量进行生长？

13.6 超嗜热的广古生菌门：热球菌目和甲烷火菌属

代表属：热球菌属（*Thermococcus*）、火球菌属（*Pyrococcus*）、甲烷火菌属（*Methanopyrus*）

少数广古生菌生长在高热的环境中，称为超嗜热菌（hyperthermophile）。这里我们将讨论处于古生菌进化树（图 13.1）根部的 3 类超嗜热广古生菌。其中热球菌属和火球菌属形成独特的热球菌目（Thermococcale）（表 13.9），它们的表型类似于 13.8 节～13.10 节讨论的超嗜热泉古生菌。甲烷火菌属与其他产甲烷菌在生理方面基本相似（见 13.4 节和表 13.5），而不同之处在于其超嗜热性和系统发育地位。

热球菌属和火球菌属

热球菌属是一种球形、超嗜热的广古生菌，存在于世界各地缺氧的热水中。细胞为圆形，具有一簇极生鞭毛，从而具有很强的运动性（图 13.12a）。热球菌属是专性厌养的化能有机营养型，以蛋白质和其他有机化合物（包括糖类）进行生长，以 S^0 为电子受体，生长的温度为 70～95℃。

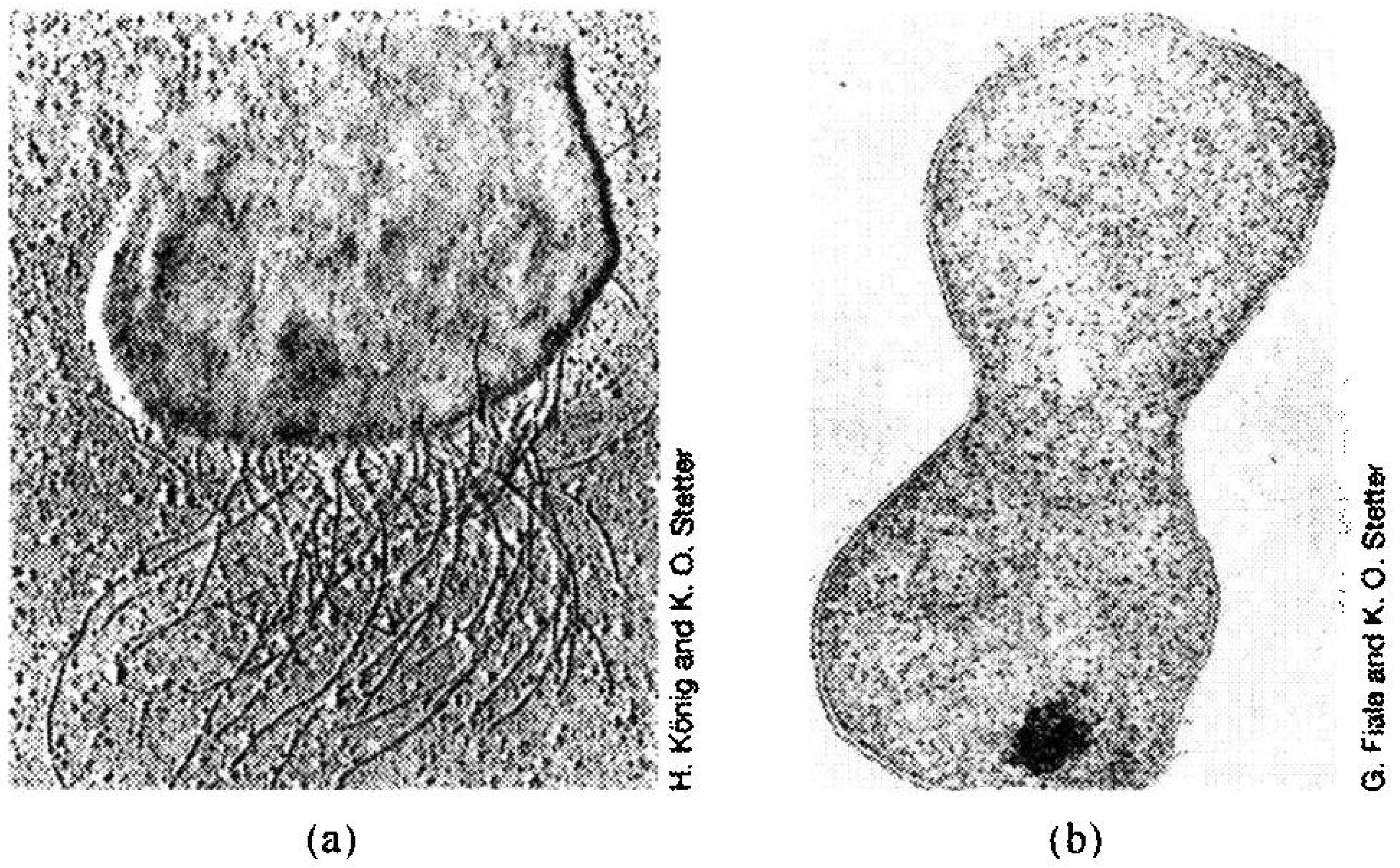
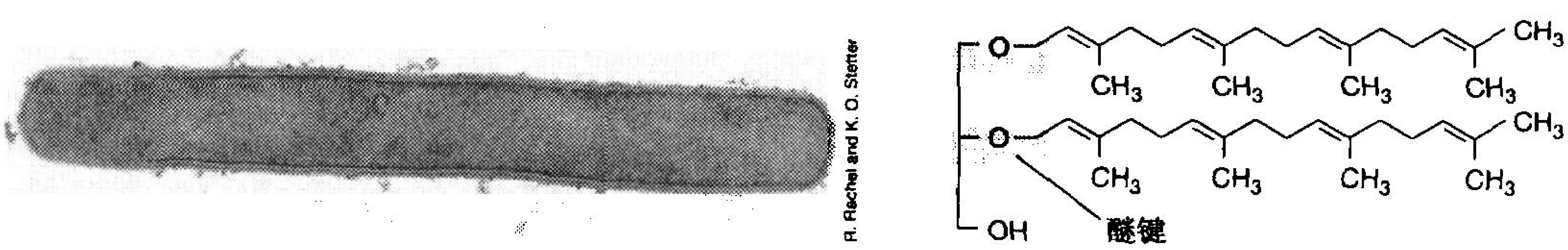


图 13.12　海底火山的球形超嗜热古生菌。(a) 速生热球菌（*Thermococcus celer*）的电镜照片（注意簇生的鞭毛）。(b) 正在分裂的激烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）超薄切片电镜照片。两种细胞的直径均约为 0.8μm。

火球菌属的形态与热球菌属相似（图 13.12b）。火球菌属（拉丁文意思为“火球”）与热球菌属的区别在于其需要很高的温度，火球菌属生长在 70～106℃，最适生长温度为 100℃。热球菌属和火球菌属在代谢上很相似。蛋白质、淀粉或麦芽糖作为电子供体被氧化，S^0作为最终的电子受体并被还原成 H_2S。将在后面介绍（表 13.8 和表 13.9）热球菌属和火球菌属的更多特征。

甲烷火菌属

甲烷火菌属（*Methanopyrus*）是一种杆状、超嗜热的产甲烷菌（图 13.13）。甲烷火菌属是从海底热水流火山口（hydrothermal vent）附近的沉淀中，以及“黑烟”的超热孔烟囱壁上分离的（见 13.8 节和 19.8 节热水流火山口的讨论）。甲烷火菌属在古生菌进化树上有独特的系统发育地位（图 13.1）。其位于古生菌进化树的根部，同时具有超嗜热菌（生长温度最高可达 110℃）和产甲烷菌的表型特征。



(a)　　　　　　　　(b)

图 13.13　甲烷火菌属。 甲烷火菌属最适生长于 100℃，只能以 CO_2+H_2产生甲烷。(a) 坎氏甲烷火菌（*Methanopyrus kandleri*）的电镜照片，所有已知产甲烷菌中最嗜热的（最高温度极限可达 110℃），细胞大小为 0.5μm×8μm。(b) 坎氏甲烷火菌新颖的类脂结构。这是古菌中常见的以醚键连接的类脂（见 4.5 节），不同的是，侧链是由植烷基形成的不饱和结构——香叶基香叶醇（geranylgeraniol）。据推测这种特殊类脂的出现早于饱和性植烷基类脂，因此甲烷火菌属是最原始的古生菌的后代，图 13.1 的资料支持这个假说。

甲烷火菌属仅能以 CO_2+H_2产生甲烷，其生长速度快，属于自养生物（在最适的生长温度 100℃下，一个世代不足 1h）。然而，与嗜中温的产甲烷菌不同，甲烷火菌属的细胞质含有大量环式 2，3-二磷酸甘油酸（一种糖酵解衍生物）。这种化合物在甲烷火菌属中的浓度高于 1mol/L，据推测其功能是一种热稳定因子，用来防止细胞内的酶和 DNA 变性（见 13.12 节）。

甲烷火菌属因含有其他生物所不具有的膜类脂而显得与众不同。古生菌类脂的甘油侧链上是以醚键连接植烷基（phytanyl）而不是脂肪酸（见 4.5 节）。其他嗜热古生菌的类脂是以醚键连接饱和的二双植烷四醚（saturated dibiphytanyl tatraether），而在甲烷嗜热菌中，其醚键连接的是一种不饱和的二双植烷四醚（图 13.13b，见 4.5 节以及图 4.19）。从合成类脂的生化途径方面考虑，我们推测这是最原始的类脂模式。与其系统发育地位、超嗜热性和厌氧代谢一起，甲烷火菌属的原始类脂使其成为最早生命形式中迷人的模式生物。

过去认为，由于温度太高而不能支持生物产生甲烷，甲烷火菌属的发现可以解释高温海洋沉积物中甲烷的起源。甲烷火菌发现于约 2000m 深的海洋，水温高达 350℃，但仍为液体。这也为超嗜热产甲烷菌存在于 110℃或更高温度提供了可能。

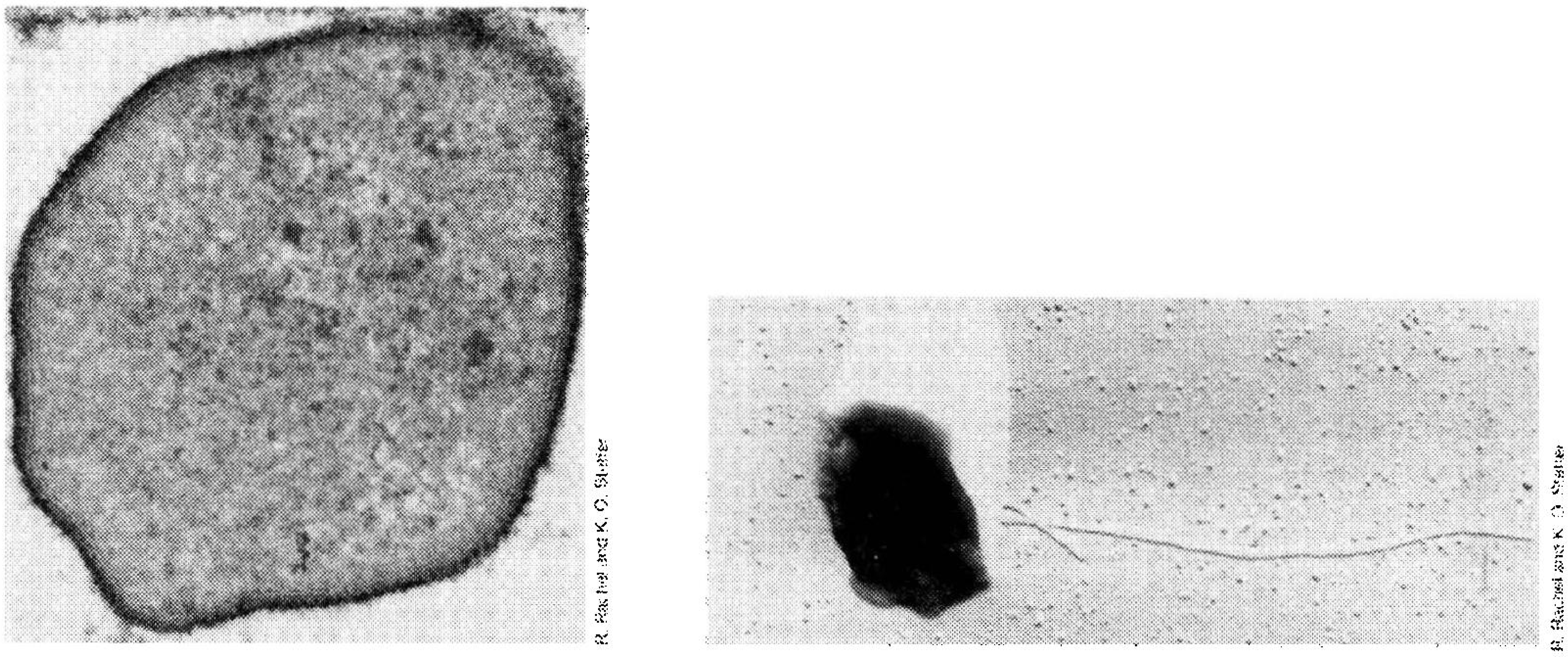
13.7 超嗜热的广古生菌门：古生球菌目

代表属：古生球菌属（*Archaeoglobus*）、铁球菌属（*Ferroglobus*）

在后面的章节我们将看到，许多超嗜热泉古生菌的无氧呼吸以 S^0 作为电子受体，把 S^0 还原成 H_2S（表 13.8）。有趣的是，这些泉古生菌都不能作为硫酸盐的还原剂，即不能将 SO_4^{2-} 还原成 H_2S。然而，一种超嗜热的广古生菌——古生球菌属，是真正的硫酸盐还原剂，其在系统发育上明显不同于其他的广古生菌（图 13.1）。

古生球菌属及其基因组

古生球菌是从热水流火山口附近的热海洋沉积物中分离到的。在其代谢过程中，通过偶联氧化 H_2、乳酸盐、丙酮酸、葡萄糖或复杂的有机化合物使硫酸盐还原成硫化物。古生球菌属的细胞为不规则球形体（图 13.14a），其最适生长温度为 83℃。



(a)　(b)

图 13.14　古生球菌目（Archaeoglobale）。（a）还原硫酸盐的嗜超高温闪烁古生球菌（*Archaeoglobus fulgidus*）的透射电子显微镜图片，细胞直径为 0.7μm。（b）一种还原氧化亚铁、硝酸盐、超嗜热的铁球菌 *Ferroglobus placidus* 的冷冻蚀刻电镜照片，细胞直径约为 0.8μm。

古生球菌属和产甲烷菌有共同的特征。我们将在第 17 章学习其产甲烷作用的生化特性。简单地说，这一过程需要一系列新的辅酶。除了极个别的例外，仅在产甲烷菌的细胞中发现这些辅酶的存在（见 17.17 节）。然而，古生球菌属也含有这些新的辅酶，并且在生长过程中也产生少量甲烷。因此，古生球菌属的系统发育与产甲烷菌密切相关（图 13.1），其在生理上是还原硫酸盐和产甲烷作用两者间的一种过渡形态。

古生球菌的基因组测序揭示了有关产甲烷作用的谜底。尽管古生球菌属能产甲烷，但其缺少产甲烷作用中的关键酶——甲基辅酶（CoM）还原酶（methyl-CoM reductase）的基因（见 17.17 节）。因此，古生球菌产生少量的甲烷并不经过这种酶的激活作用，而是通过我们还不清楚的其他途径产生的。古生球菌属的基因组包含 2400 个基因，很多基因与产甲烷菌共有（见 13.4 节）。然而，古生球菌属的基因组中也有许多特有的基因，是古生菌广泛的遗传多样性的典型代表。与细菌中的情况相似，每个古生菌

基因组中大约 1/3 的基因是其特有的，在其他任何生物中都不存在（见 15.3 节）。

铁球菌属

铁球菌属（图 13.14b）与古生球菌属相近，但并不能还原硫酸盐，而是一种能氧化 Fe^{2+} 的化能无机自养型生物，通过将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 并将 NO_3^- 还原成 NO_2^- 和 NO 而储存能量（表 13.8）。在代谢过程中，铁球菌属也能以 H_2 或 H_2S 作为电子供体。铁球菌属从浅海热水流火山口分离得到，其最适的生长温度为85℃。

铁球菌属的许多方面都非常有趣，最突出的是其可在缺氧的条件下将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}。这一过程可解释为什么在原始岩石中有大量的 Fe^{3+}，例如，条纹状的含铁物质最初被认为是由蓝细菌（cyanobacteria）产生的 O_2 氧化 Fe^{2+} 而成（有氧光合作用）。铁球菌属的代谢暗示着我们应重新测定蓝细菌以及地球产氧的起源年代（见 11.1 节和 11.2 节）。一些不产氧的光合细菌也能在缺氧的条件下氧化 Fe^{2+}（见 17.11 节）。因此，肯定存在着几种不同的缺氧条件下形成 Fe^{3+} 的路线，这对蓝细菌开始进化的精确时间提出了挑战（图 11.8）。

概念检查

超嗜热的广古生菌门包括热球菌目、古生球菌目和甲烷火菌属。这些生物的最适生长温度高于 80℃。

◆ 热球菌属与甲烷火菌属的代谢有何不同？

◆ 哪一种超嗜热的广古生菌是真正的硫酸盐还原菌？

◆ 铁球菌属与古生球菌属的代谢有何不同？

Ⅲ 泉古生菌门

泉古生菌与广古生菌的系统发育不同（图 13.1），泉古生菌门（Crenarchaeota）的代表菌能生存于自然界的两个极端温度：沸水和冰水。然而，所有可培养的泉古生菌都属于超嗜热菌（最适生长温度高于 80℃），并且有些菌的最适生长温度高于水的沸点。下面我们先对泉古生菌的栖息地以及能量代谢做一个总的概括，然后再对一些主要属的特征进行叙述。

13.8 泉古生菌的栖息地及能量代谢

表 13.7 概述了泉古生菌的栖息地，包括非常热和非常冷的环境。大多数超嗜热古生菌分离于热的土壤、含元素硫和硫化物的水（图 13.15），并且许多种可利用某种途径代谢硫。陆地、富硫泉、沸泥沼和土壤的温度都可能会超过 100℃，并且 H_2S 和 S^0 被生物氧化后生成的硫酸（H_2SO_4）会使环境由弱酸性变成极强的酸性（见 17.10 节和 19.13 节）。这种热的、富硫的环境我们称之为硫磺温泉（salfatara），其遍布世界各地（图 13.15），如意大利、冰岛、新西兰及怀俄明州的黄石公园（美国）。

表 13.7　泉古生菌的栖息地

特性	热的区域[a]		非热区域[b]
	陆地	海域	
地点	硫磺温泉（热泉、喷气孔、沸泥锅、蒸气加热的土壤），地热电站、地壳深处	海底热泉、热的沉积物及孔洞（“黑烟囱”）、深蓄油池	浮游于海洋、海岸及南极深处的水、海冰、海绵共生体
温度	表面温度达 100℃、地下高于100℃	高达400℃（烟囱）	−2～+4℃
盐度/pH	一般低于1%NaCl；pH0.5～9	适度，大约3%NaCl；pH5～9	3%～8% NaCl；pH7～9
气体及其他营养	CO_2、CO、CH_4、H_2、H_2S、S^0、$S_2O_3^{2-}$、SO_4^{2-}、NH_4^+、N_2	与陆地所述相同	CO_2、N_2、O_2、供化能无机自养型利用的NH_4^+等无机物

a. 见图 13.10 和图 13.15（图 19.19～图 19.21）。

b. 见图 13.16，有些广古生菌也存在于海水中。

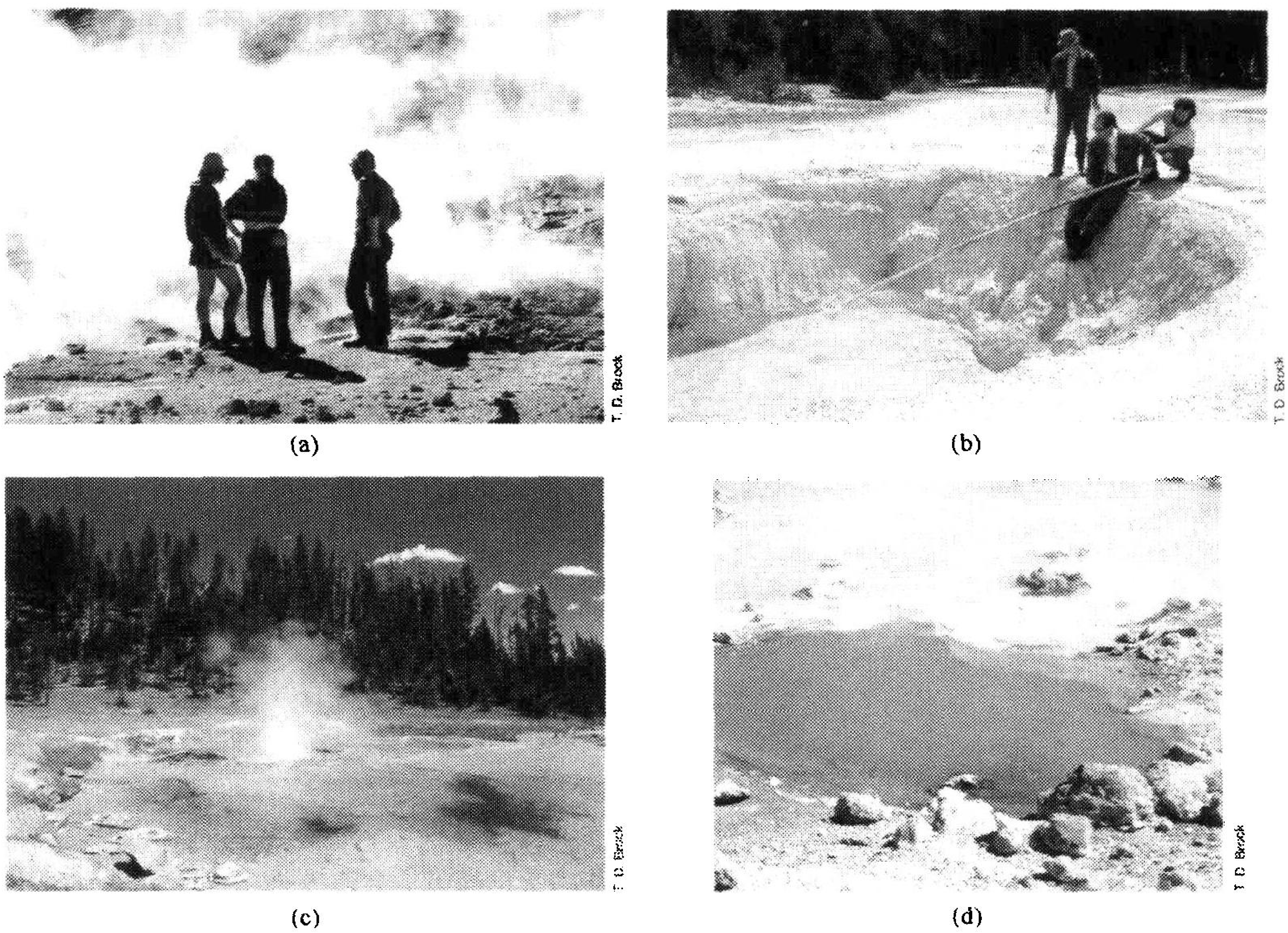


图 13.15　超嗜热古生菌的栖息环境。（a）黄石公园的典型硫磺温泉。H_2S 蒸气从地表冒出。由于高热和高酸，只有原核生物生存。（b）富硫热泉，有大量硫化叶菌（*Sulfolobus*）栖息。硫化叶菌及相关的原核生物将 H_2S 和 S^0 氧化成 H_2SO_4，使硫磺温泉以及硫泉呈酸性。（c）黄石公园典型的中性沸水泉——帝国间歇泉，很多种超嗜热的古生菌栖息于此。（d）一种富铁的地热泉，硫化叶菌的另一种栖息地，酸性环境的产生源于 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}（而不是 S^0 氧化成 SO_4^{2-}）［$Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 + 3H^+$］。

根据周围的地理环境不同，硫磺温泉从弱碱性到弱酸性不等，pH 5～8，有时也会

是极端酸性，pH 低于 1。从这两种类型的环境中均已分离到超嗜热的泉古生菌，但大多数栖息在中性或弱酸性的热环境。除了这些天然的栖息地以外，它们也能在人工的高热环境中、尤其是地热电站的流出物中繁殖生长。

超嗜热的泉古生菌也栖息于海底热泉——热水流火山口。我们将在 19.8 节讨论这些栖息地的地理环境以及存在的微生物。这里我们要知道，由于压力、海底的温度会高于海面。实际上，所有最适生长温度在 100℃以上的超嗜热菌都来自海底。喷口有浅喷口（2～10m）如远离海岸的意大利火山和深喷口（2000～4000m）如海洋扩张中心附近（见 19.8 节）。深喷口是目前所知的最热的微生物栖息地。

冷环境泉古生菌

与超嗜热古生菌相反，冷环境泉古生菌（表 13.7）是从一些非热的环境中通过 rRNA 基因的群落采样分析鉴定出的。例如，利用荧光标记的系统发育探针（见 11.7 和 18.4 节）可从世界各地的海水中发现泉古生菌（图 13.16b）。与超嗜热菌截然不同的是，海洋泉古生菌甚至能在南极地区等寒冷的水和海冰中生存（图 13.16a）。冷环境泉古生菌以很大的数量（约 10^4 个/ml）浮游于（或自由悬浮或附着于水中的颗粒）营养缺乏的较冷区域（2～4℃的海水及 0℃以下的海冰）。尽管冷环境泉古生菌的生理特性还是个谜，然而，过滤海水收集到泉古生菌后，对其类脂的分析显示它们具有以醚键连接的类脂（古生菌的特征标记）（见 4.5 节和 11.9 节）。海洋泉古生菌的生态学将在 19.6 节讨论。

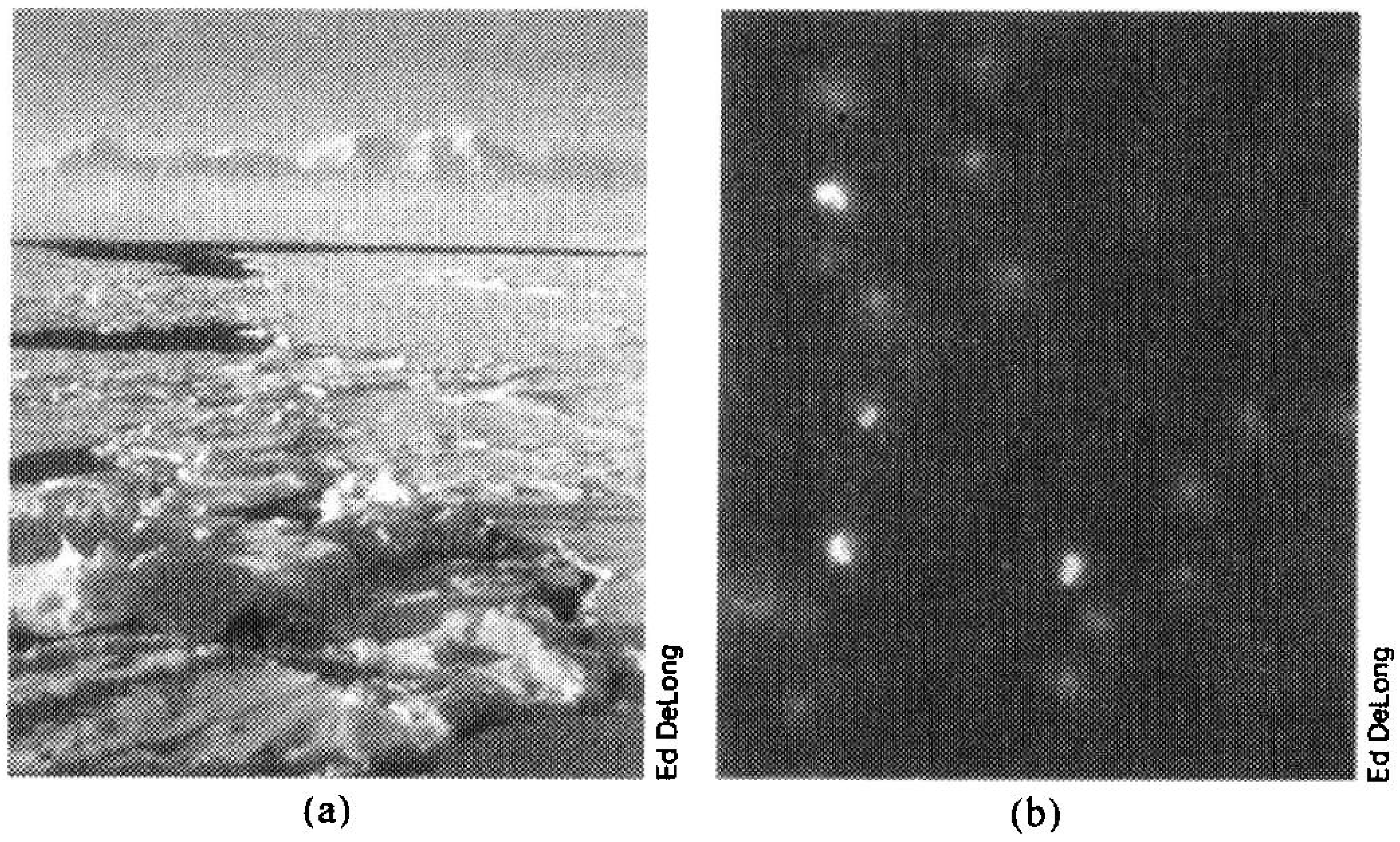


图 13.16 冷环境泉古生菌。（a）从船上拍的南极半岛的照片。冰下是寒冷的水，栖息着冷环境泉古生菌。（b）系统发育染色剂处理过的海水的荧光显微照片。这种系统发育染料由绿色荧光染料连接一段与泉古生菌的 16S rRNA 信号序列互补的寡核苷酸组成（见 11.7 节方法的描述）。DAPI 可对所有细胞染色使之呈蓝色（见 18.3 节和图 18.6）。绿色细胞是冷环境泉古生菌。见 19.6 节和图 19.13 对开放性海洋中细菌和古生菌的描述。

在海水中也存在广古生菌的某些种类。研究发现，这些冷环境广古生菌聚集于海洋的表层，而冷环境泉古生菌更多地存在于较冷（图 13.16a）、较深的海水中（见 19.6

节和图 19.13)。

能量代谢

除个别例外，大多数超嗜热泉古生菌是专性厌氧菌。它们的产能代谢是化能有机营养型或化能无机营养型（如硫化叶菌两者兼具），并包括很多不同的电子供体和受体（表 13.8）。发酵现象很少发生，而大部分的生物能量都依赖于无氧呼吸（表 13.8）。在呼吸中能量形成的方式和细菌中的机制相同：电子传递到细胞膜上形成质子动力势能，驱动 ATP 酶合成 ATP（见 5.12 节）。

表 13.8　超嗜热古生菌的产能反应

营养类型	产能反应	代谢类型	菌例
化能有机	有机物+$S^0 \rightarrow H_2S+CO_2$	厌氧	热变形菌属（*Thermoproteus*）、热球菌属（*Thermococcus*）、硫还原球菌属（*Desulfurococcus*）、热丝菌属（*Thermofilum*）、火球菌属（*Pyrococcus*）
	有机物+$SO_4^{2-} \rightarrow H_2S+CO_2$	厌氧	古生球菌属（*Archaeoglobus*）
	有机物+$O_2 \rightarrow H_2O+CO_2$	好氧	硫化叶菌属（*Sulfolobus*）
	有机物→CO_2+H_2+脂肪酸	发酵	葡萄嗜热菌属（*Staphylothermus*）、热网菌属（*Pyrodictium*）
	有机物+$Fe^{3+} \rightarrow CO_2+Fe^{2+}$	厌氧	热网菌属
	丙酮酸→CO_2+H_2+乙酸盐	发酵	火球菌属
化能无机	$H_2+S^0 \rightarrow H_2S$	厌氧	酸菌属（*Acidianus*）、热网菌属、热变形菌属、栖冥河菌属（*Stygiolobus*）、火焰球菌属（*Ignicoccus*）
	$H_2+NO_3 \rightarrow NO_2^-+H_2O$（某些种将 NO_2^- 还原成 N_2）	厌氧	热棒菌属（*Pyrobaculum*）
	$4H_2+NO_3^-+H^+ \rightarrow NH_4^++2H_2O+OH^-$	厌氧	火叶菌属（*Pyrolobus*）
	$H_2+2Fe^{3+} \rightarrow 2Fe^{2+}+2H^+$	厌氧	热棒菌属、热网菌属、古生球菌属
	$2H_2+O_2 \rightarrow 2H_2O$	好氧	酸菌属、硫化叶菌属、热棒菌属
	$2S^0+3O_2+2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$	好氧	硫化叶菌属、酸菌属
	$2FeS_2+7O_2+2H_2O \rightarrow 2FeSO_4+2H_2SO_4$	好氧	硫化叶菌属、酸菌属、生金球形菌属（*Metallosphaera*）
	$2FeCO_3+NO_3^-+6H_2O \rightarrow 2Fe(OH)_3+NO_2^-+2HCO_3^-+2H^++H_2O$	厌氧	铁球菌属（*Ferroglobus*）
	$4H_2+SO_4^{2-}+2H^+ \rightarrow 4H_2O+H_2S$	厌氧	古生球菌属（*Archaeoglobus*）
	$4H_2+CO_2 \rightarrow CH_4+2H_2O$	厌氧	甲烷火菌属（*Methanopyrus*）、甲烷嗜温球菌属（*Methanocaldococcus*）、甲烷嗜热菌属（*Methanothermus*）

许多超嗜热的泉古生菌可在无氧条件下进行化能无机自养，以 H_2 为电子供体，以 S^0 或 NO_3^- 为电子受体；有些可在有氧的条件下氧化 H_2（表 13.8）。在一些超嗜热古菌中也存在以 Fe^{3+} 为电子受体的 H_2 呼吸作用（表 13.8）。其他的化能无机营养型包括在

有氧条件下氧化 S^0 和 Fe^{2+}，或无氧条件下以 NO_3^- 为电子受体氧化 Fe^{2+}（表 13.8）。目前已知仅一种超嗜热古生菌能还原硫（广古生菌的古生球菌属，见 13.7 节）。在这里，唯一不存在的生物产能方式是光合作用。最嗜热的光合营养型古生菌可在 73℃生长，比大多数超嗜热菌的生长温度低的多（表 13.9）。

表 13.9 一些超嗜热泉古生菌的特性

分类/属[a]	形态	与 O_2 关系[b]	DNA/(mol%GC)	温度			最适 pH
				最低	最适	最高	
硫化叶菌目（Sulfolobales）							
硫化叶菌属（*Sulfolobus*）	叶状球形	好氧	37	55	75	87	2～3
酸菌属（*Acidianus*）	球状	兼性	31	60	88	95	2
生金球形菌属（*Metallosphaera*）	球状	好氧	45	50	75	80	2
栖冥河菌属（*Stygiolobus*）	叶状球形	厌氧	38	57	80	89	3
斯梯特氏菌属（*Stetteria*）	球状	厌氧	65	68	95	102	6
恐硫球菌属（*Sulfophobococcus*）	盘状	厌氧	54～56	70	85	95	7.5
热球形菌属（*Thermosphaera*）	球状	厌氧	46	67	85	90	7
热变形菌目（Thermoproteales）							
热变形菌属（*Thermoproteus*）	杆状	厌氧	56	60	88	96	6
嗜热杆菌（*Thermophilum*）	杆状	厌氧	57	70	88	95	5.5
热棒菌属（*Pyrobaculum*）	杆状	兼性	46	74	100	102	6
喜温枝状菌属（*Caldivirga*）	杆状	厌氧	43	60	85	92	4
喜热温菌属（*Thermocladium*）	杆状	厌氧	52	60	75	80	4.2
硫还原球菌目（Desulfurococcales）							
硫还原球菌属（*Desulfurococcus*）	球形	厌氧	51	70	85	95	6
气火菌属（*Aeropyrum*）	球形	好氧	56	70	95	100	7
葡萄嗜热菌属（*Staphylothermus*）	簇球状	厌氧	35	65	92	98	6～7
热网菌属（*Pyrodictium*）	以细丝黏着的盘形	厌氧	62	82	105	110[b]	6
火叶菌属（*Pyrolobus*）	叶状球形	兼性	53	90	106	113	5.5

续表

分类/属[a]	形态	与 O_2 关系[b]	DNA/(mol%GC)	温度			最适 pH
				最低	最适	最高	
硫还原球菌目（Desulfurococcales）							
热盘菌属（*Thermodiscus*）	盘状	厌氧	49	75	90	98	5.5
火焰球菌属（*Ignicoccus*）	不规则球形	厌氧	35	65	90	103	5
栖高温菌属（*Hyperthermus*）	不规则球形	厌氧	56	75	102	108	7
硫磺球形菌属（*Sulfurisphaera*）	球形	兼性	33	63	84	92	2
硫磺球菌属（*Sulfurococcus*）	球形	好氧	43～46	40	75	85	2.5
古生球菌目（Archaeoglobales）[c]							
古生球菌属（*Archaeoglobus*）	球形	厌氧	46	64	83	95	7
铁球菌属（*Ferroglobus*）	不规则球形	厌氧	43	65	85	95	7
热球菌目（Thermococcales）[c]							
热球菌属（*Thermococcus*）	球形	厌氧	38～57	70	88	98	6～7
火球菌属（*Pyrococcus*）	球形	厌氧	38	70	100	106	6～8

a. 以 ales 结尾的表示“目”（见 11.10 节）。
b. 该种的生长温度可达 121℃。
c. 在系统发育上，这一目的属是广古生菌中的成员，为超嗜热菌（见 13.6 节和 13.7 节）。

对超嗜热泉古生菌的栖息地以及能量代谢有一个基本的认识后，下面我们介绍几种有代表性的泉古生菌。

13.9 栖息于陆地火山的超嗜热菌：硫化叶菌目和热变形菌目

代表属：硫化叶菌属（*Sulfolobus*）、酸菌属（*Acidianus*）、热变形菌属（*Thermoproteus*）、热棒菌属（*Pyrobaculum*）

火山地区的温度高达 100℃，因而适宜超嗜热古生菌生存。硫化叶菌属和酸菌属就是从这种环境中分离到的，它们的系统发育相近，组成嗜热的硫化叶菌目（表 13.9）。

硫化叶菌目（Sulfolobales）

硫化叶菌生长在 90℃、pH 1～5、富硫的酸热泉中*（图 13.15）。硫化叶菌（图

* 回顾：1970 年，托马斯布若克及其同事首先发现了硫化叶菌，1972 年对其进行了正式描述。硫化叶菌及其先前分离出来的水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）（热稳定性的 *Taq* DNA 聚合酶源于此菌，见 7.9 节），被普遍公认为是超嗜热微生物学领域的开端。硫化叶菌是发现的第一个可以在 80℃以上生长的原核生物。托马斯·布若克是本书最初 7 个版本的资深作者，目前是麦迪逊市威斯康星州大学的名誉教授。20 世纪 80 年代至今，德国雷根斯堡大学的卡尔·斯戴特及其同事发现了许多新的属和种，从而大大扩展了嗜热微生物学的研究领域。

13.17a）是一种能把 H_2S 或 S^0 氧化 H_2SO_4 的好氧型化能无机营养菌，可固定 CO_2 作为碳源。硫化叶菌也能进行化能有机营养生长。其细胞大体上为球形，但呈明显的叶状（图 13.17a）。用荧光染料进行显微观察可以看到硫化叶菌的细胞紧紧地黏附在硫晶体上（图 17.26b）。除了硫或有机物的好氧呼吸外，硫化叶菌也能将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}，这一点已被用于在高温下冶炼铁或铜矿（见 19.15 节）。

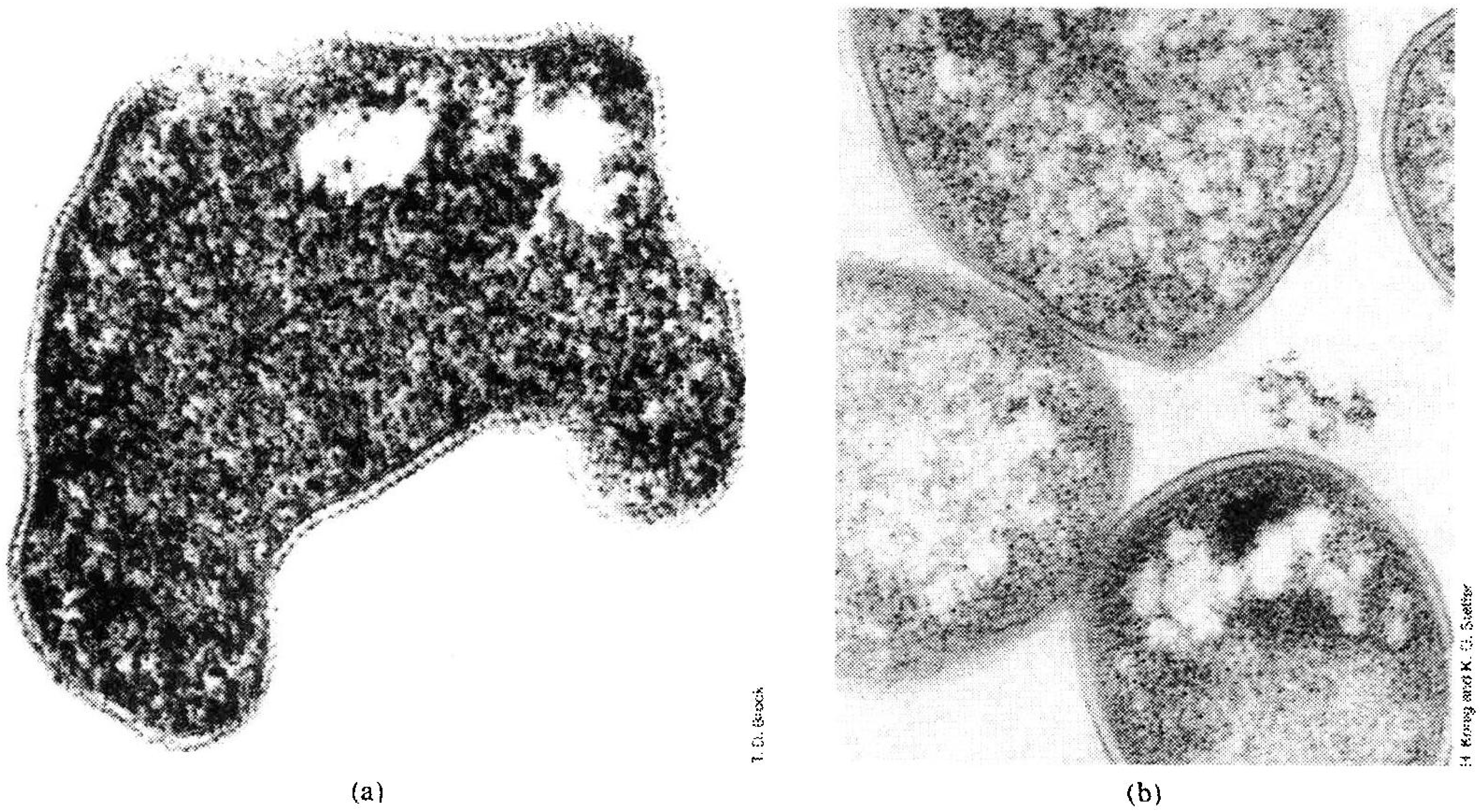


图 13.17 嗜酸的超嗜热古生菌——硫化叶菌目。（a）嗜酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）薄切片的电镜照片。（b）下层酸菌（*Acidianus infernus*）薄切片的电镜照片。两种菌的直径范围为 0.8～2μm。

一种同硫化叶菌相似的好氧菌也存在于酸性硫磺温泉中，这种细菌被称为酸菌属（图 13.17b），它与硫化叶菌的主要区别在于酸菌属具有厌氧生长的能力。值得注意的是，酸菌属在好氧和厌氧条件下均能利用 S^0。在好氧条件下，酸菌属以 S^0 为电子供体，以 O_2 为电子受体，将 S^0 氧化成 H_2SO_4。在厌氧条件下，酸菌属以 S^0 为电子受体（以 H_2 作为电子供体），生成还原产物 H_2S。这样，在酸菌属中，S^0 的代谢命运取决于有没有 O_2 存在。与硫化叶菌属相似，酸菌属在形态上大致为球形，但没有明显的叶状（图 13.17b），它们的生长温度范围为 65～95℃，最适生长温度为 90℃。

热变形菌目（Thermoproteales）

代表属：热变形菌属（*Thermoproteus*）、热丝菌属（*Thermofilum*）、热棒菌属（*Pyrobaculum*）。

热变形菌属和热丝菌属的细胞为杆状，生活在中性或微酸性温泉中。热变形菌属的细胞是直径为 0.5μm 坚硬杆状，其长度变化很大，从 1～2μm 的短细胞到 70～80μm 的长丝状（图 13.18a）。热丝菌属的菌丝更细，其宽度仅为 0.17～0.35μm，丝状细胞长达 100μm（图 13.18b）。

热变形菌属和热丝菌属是以 S^0 为基质进行无氧呼吸的专性厌氧菌（表 13.8）。与大

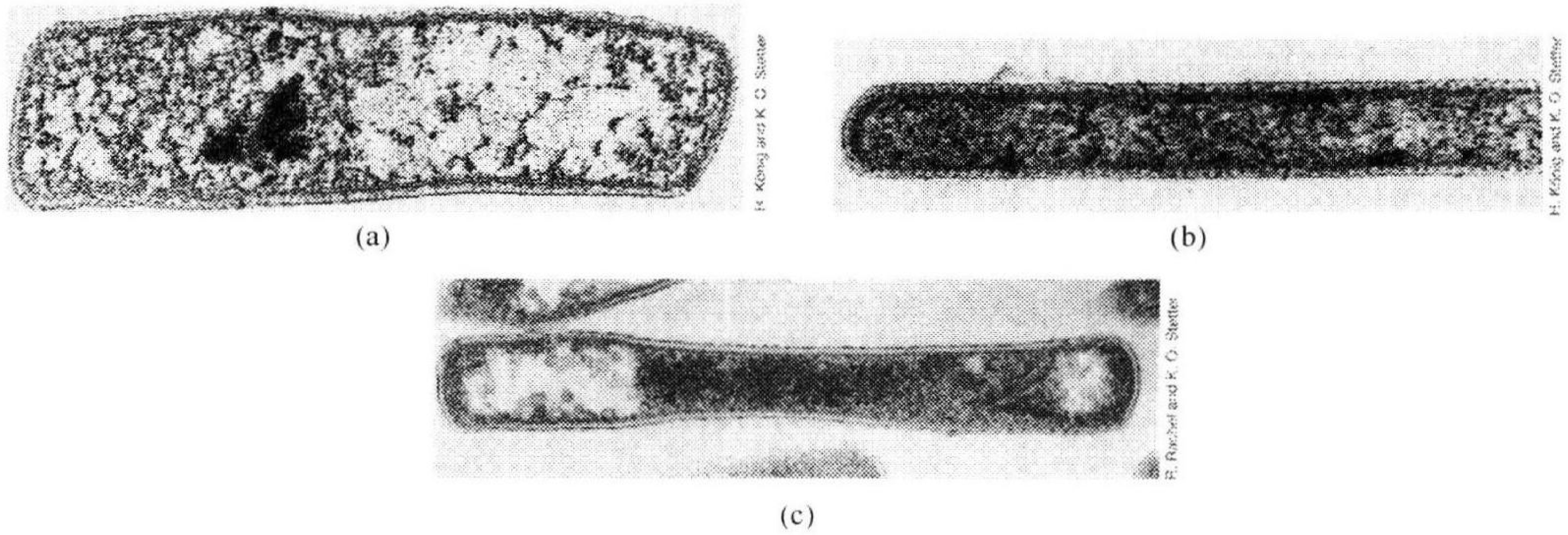


图 13.18　杆状的超嗜热古生菌——热变形菌目。（a）嗜中性热变形菌（*Thermoproteus neutrophilus*）的薄切片电镜照片，细胞直径约为 0.5μm。（b）热丝菌 *Thermofilum librum* 细胞直径仅为 0.25μm。（c）好气热棒菌属（*Pyrobaculum aerophilum*）薄切片电镜照片，细胞大小 0.5μm ×3.5μm。

多数的超嗜热菌不同，热变形菌属和热丝菌属对氧极其敏感，这一点比得上产甲烷菌（见 13.4 节）。因此，在培养时必须严格预防氧的存在。许多热变形菌能在有 H_2的环境中进行无机化能营养生长，或者在复杂的含碳物质（如酵母膏、小肽、淀粉、葡萄糖、乙醇、苹果酸、延胡索酸、甲酸盐）上进行化能有机营养生长（表 13.8）。热变形菌属和热丝菌属具有相近的 GC 碱基比率（56%～58%），但通过核酸杂交分析发现两者的基因组明显不同（见 11.11 节）。

热棒菌属（图 13.18c）是一种杆状的超嗜热菌，但在生理上它与热变形菌目其他的属至少有一点不同，即热棒菌属的一些种可进行有氧呼吸。另外，在培养热棒菌时，热棒菌能以 NO_3^-、Fe^{3+}或 S^0为电子受体，以 H_2为电子供体（化能无机自养型生长）进行无氧呼吸。热棒菌属的其他一些种能以有机物为电子供体进行厌氧生长，将 S^0还原为 H_2S。热棒菌属是从陆地的热泉以及热水流火山口分离出来的，最适生长温度为 100℃。

13.10　栖息于海底火山的超嗜热菌：硫还原球菌目

代表属：热网菌属（*Pyrodictium*）、火叶菌属（*Pyrolobus*）、火焰球菌属（*Ignicoccus*）、葡萄嗜热菌属（*Staphylothermus*）

现在我们把注意力转向栖息于海底（submarine）火山的微生物，已知的大部分嗜热古生菌栖息于海底火山。这些栖息地包括浅水区的热泉和深海的热水流火山口。我们将在 19.8 节讨论这些微生物栖息地的地质状况。下面我们将要讨论的微生物组成了古生菌的一个目——硫还原球菌目（Desulfurococcales）（表 13.9）。

热网菌属和火叶菌属

热网菌属和火叶菌属是微生物中最适生长温度高于 100℃的典型代表。热网菌属的最适生长温度为 105℃，火叶菌属的最适生长温度为 106℃。热网菌属的细胞呈不规则

的盘状，在培养基中长成类似菌丝体的菌层并附着于硫晶体。成团的细胞由微丝构成一个大网，单个的细胞附着在网上（图 13.19a、b）。微丝的中心是空的，由蛋白质构成，其排列方式与细菌鞭毛蛋白相似（见 4.14 节）。然而，微丝不具有运动功能，而是用于细胞的依附固定（图 13.22）。热网菌的细胞壁由糖蛋白组成。热网菌属是严格的厌氧菌，能进行化能无机营养，在有 H_2的环境中以 S^0为电子受体，也可在复杂有机物上以化能有机营养方式生长（表 13.8）。

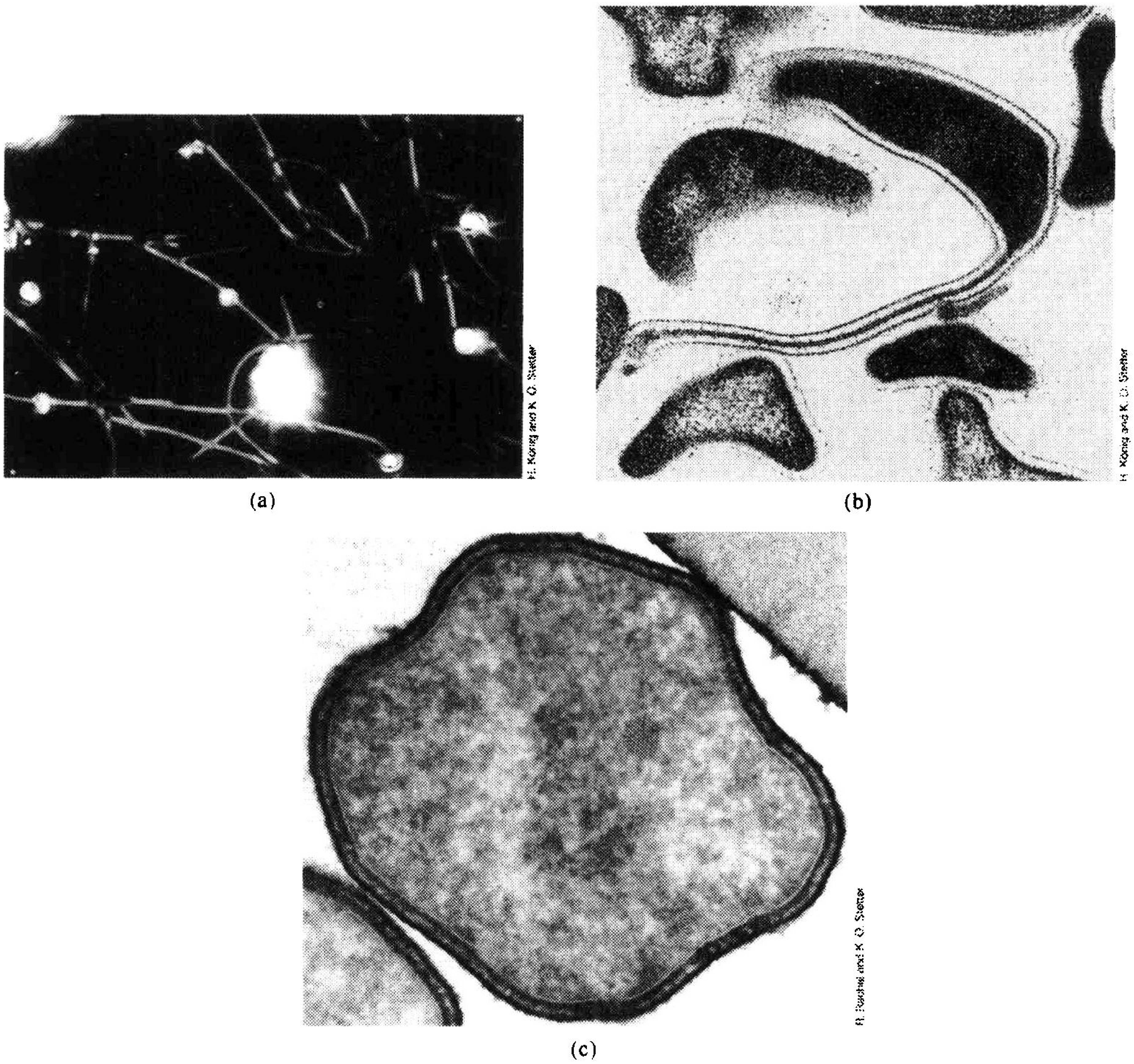


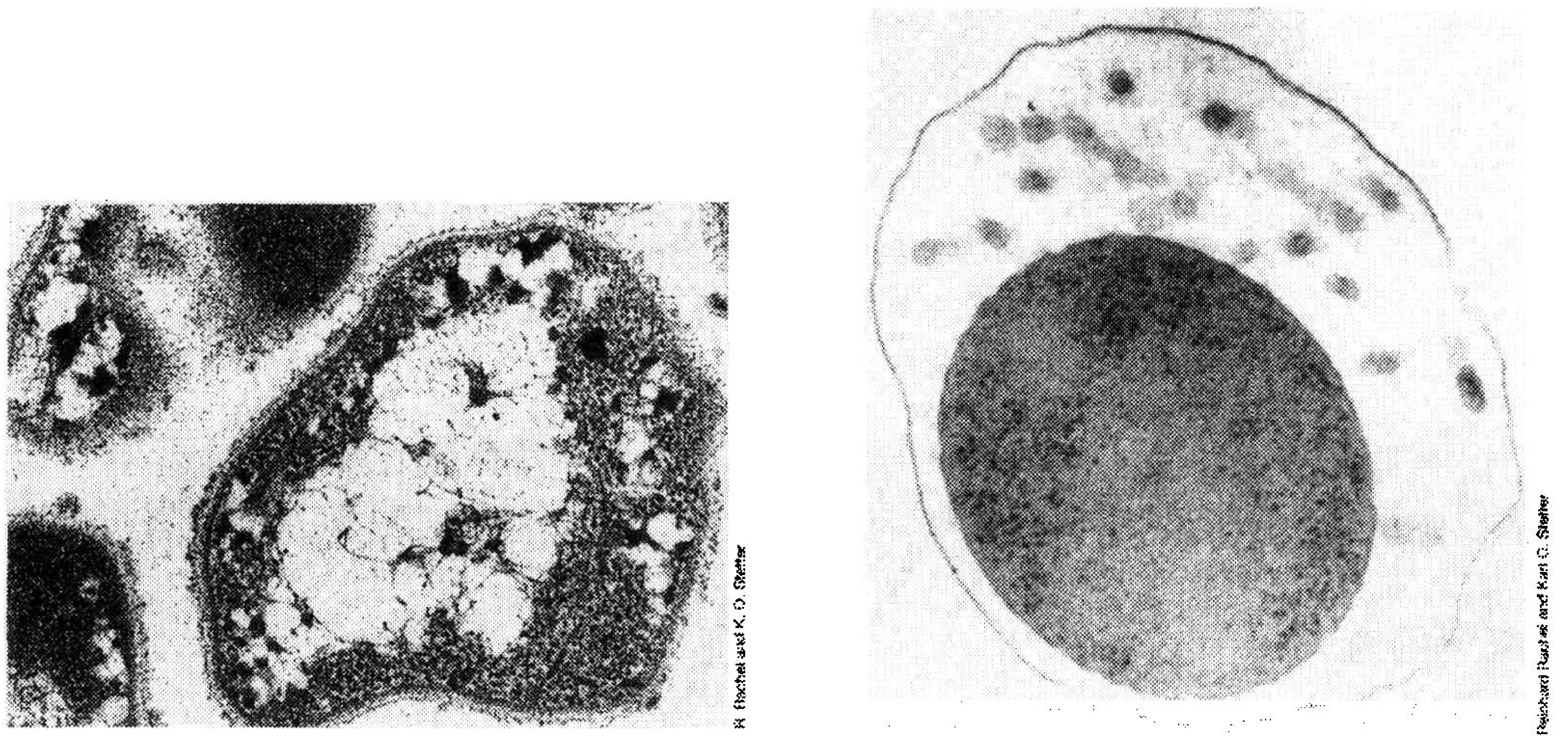
图 13.19　硫还原球菌目的最适生长温度大于 100℃。（a）隐蔽热网菌（*Pyrodictium occultum*）（最适生长温度 105℃）的暗视野显微图片。（b）隐蔽热网菌的薄切片显微照片，细胞长度为 0.3～2.5μm。（c）已知最嗜热的原核生物——延胡索酸火叶菌的切片，最适生长温度 106℃，单细胞直径约 1.4μm。

延胡索酸火叶菌（*Pyrolobus fumarii*）（图 13.19c）创造了目前所知最嗜热原核生物的记录，其最高的生长温度达 113℃（表 13.9）。火叶菌生长于热水流火山口处“黑烟”的烟囱壁上（见 19.8 节和图 19.20），其自养能力为它在这种无机环境中提供有机碳。火叶菌属的其他种甚至可在高于 113℃的环境中生长，所以这个属包含了已知最嗜热的微生物。

火叶菌的细胞呈球状（图 13.19c），其细胞壁由蛋白质组成。火叶菌是专性需 H_2 的化能无机营养型，通过氧化 H_2 并还原 NO_3^-（生成 NH_4^+）、$S_2O_3^{2-}$（生成 H_2S）或很低浓度的 O_2（生成 H_2O）而生长。除了极端嗜热性，火叶菌属还可忍受高于其最高生长温度的条件。例如，延胡索酸火叶菌可在 121℃的高温下生存 1h，而在这个温度下，即使细菌的芽孢也经受不住（见 4.13 节）。

硫还原球菌属和火焰球菌属

硫还原球菌目中其他值得注意的属有硫还原球菌属（*Desulfurococcus*）（硫还原球菌目就是根据它而命名的）（图 13.20a）和火焰球菌属。硫还原球菌属是严格厌氧的还原 S^0 菌，这一点与热网菌属类似，但不同的是其嗜热性低一些，最适生长温度为 85℃。



(a)　　(b)

图 13.20　硫还原球菌目的一些种，最适生长温度低于沸点。(a) 嗜糖硫还原球菌（*Desulfurococcus saccharovorans*）的细胞切片，细胞直径为 0.7μm。(b) 冰岛火焰球菌（*Ignicoccus islandicus*）的细胞切片，细胞被一个大的周质包围（见 4.9 节），细胞直径约为 1μm，但加上周质直径有 1.4μm。

火焰球菌属的最适生长温度为 90℃，其代谢底物为 H_2/S^0（表 13.8），这一点与许多超嗜热古生菌相似。火焰球菌属（图 13.20b）是一种新的超嗜热菌，其含有与细菌相似的外膜（见 4.9 节）。然而火焰球菌的外膜很特殊，远离于细胞膜。这种结构使得火焰球菌形成一个大的周质（图 13.20b）。实际上，火焰球菌周质（periplasm）的体积是其细胞质（cytoplasm）的 2～3 倍，这一点与 G^- 菌不同，G^- 菌周质的体积一般为细胞质的 25%。火焰球菌的周质也含有膜结合的泡囊（图 13.20b），其功能可能是向细胞外运输物质。另外，火焰球菌属的一些种是较小的寄生性原核生物——纳米古生菌属的宿主，关于纳米古生菌我们将在下一节讨论。

葡萄嗜热菌属

在硫还原球菌目中，葡萄嗜热菌属的系统发育比较特殊（图 13.21）。葡萄嗜热菌

的直径约 1μm、球形，大约 100 个细胞聚集一起类似于葡萄球菌（*Staphylococcus*）（比较图 13.21 和图 4.4b）。葡萄嗜热菌属不是化能无机营养而是化能有机营养——这一点与其他超嗜热菌不同，其最适的生长温度为 92℃。葡萄嗜热菌通过发酵蛋白胨生成乙酸脂肪酸和异戊酸等而获得能量（表 13.8）。

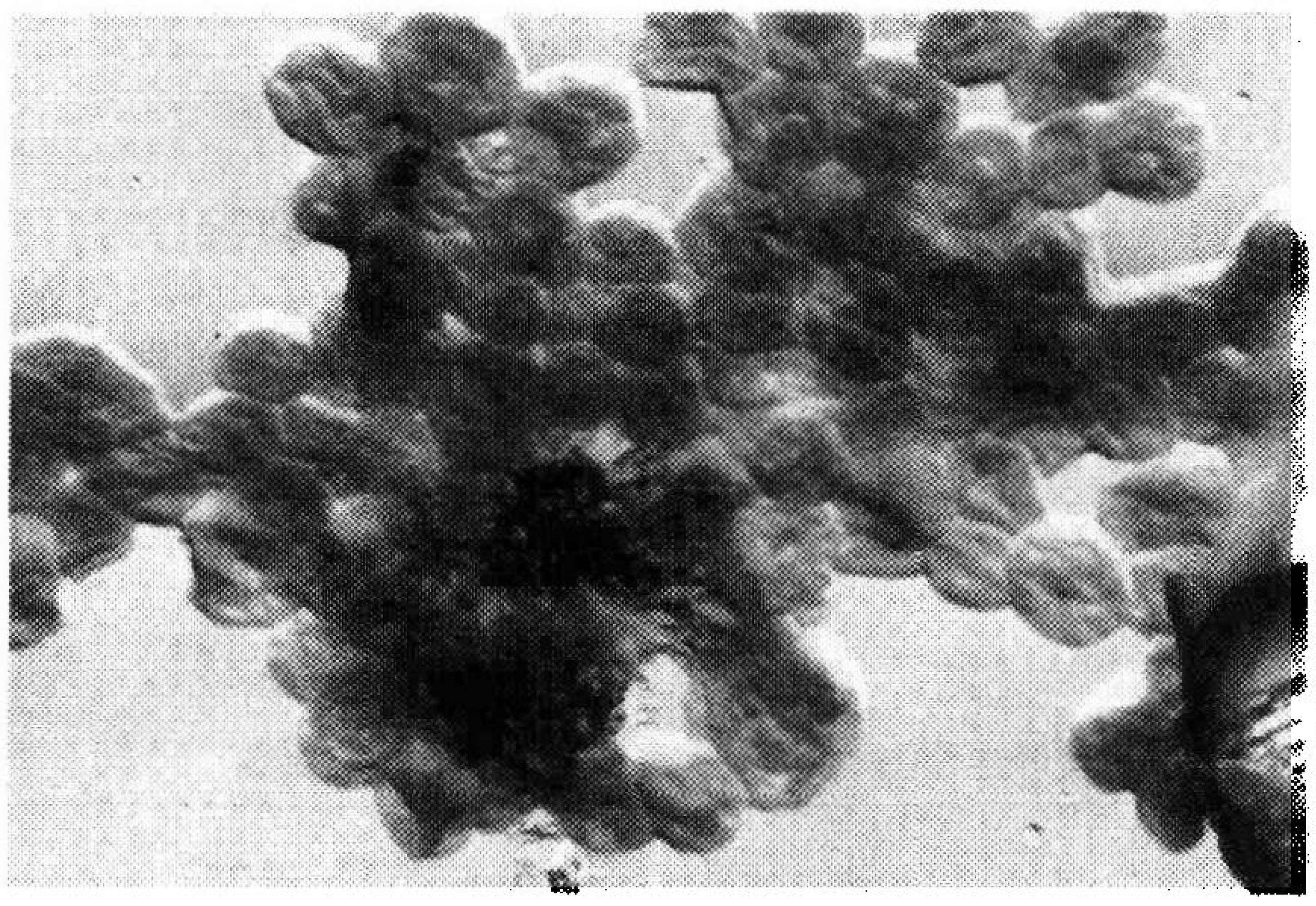


图 13.21 超嗜热的海葡萄嗜热菌（*Staphylothermus marinus*）（最适生长温度为 92℃）。细胞喷涂后的电镜照片，单细胞直径约 1μm。

从浅海热水流火山口和超热的“黑烟”中都能分离到葡萄嗜热菌属（见 19.8 节）。葡萄嗜热菌属广泛分布于浅海热水区域，在这里它可以分解生物死亡后释放的蛋白质。

概念检查

超嗜热的泉古生菌栖息于已知能有生命存在的最热的环境。在一些寒冷环境中也发现有泉古生菌的存在。泉古生菌的形态各种各样，它们以几种不同的代谢方式进行生长。

◆ 硫化叶菌属和火叶菌属的最大区别是什么？葡萄嗜热菌属和火焰球菌属的最大区别又是什么？

◆ 在代谢 S^0 方面，酸菌属的有哪些特异的代谢特征？

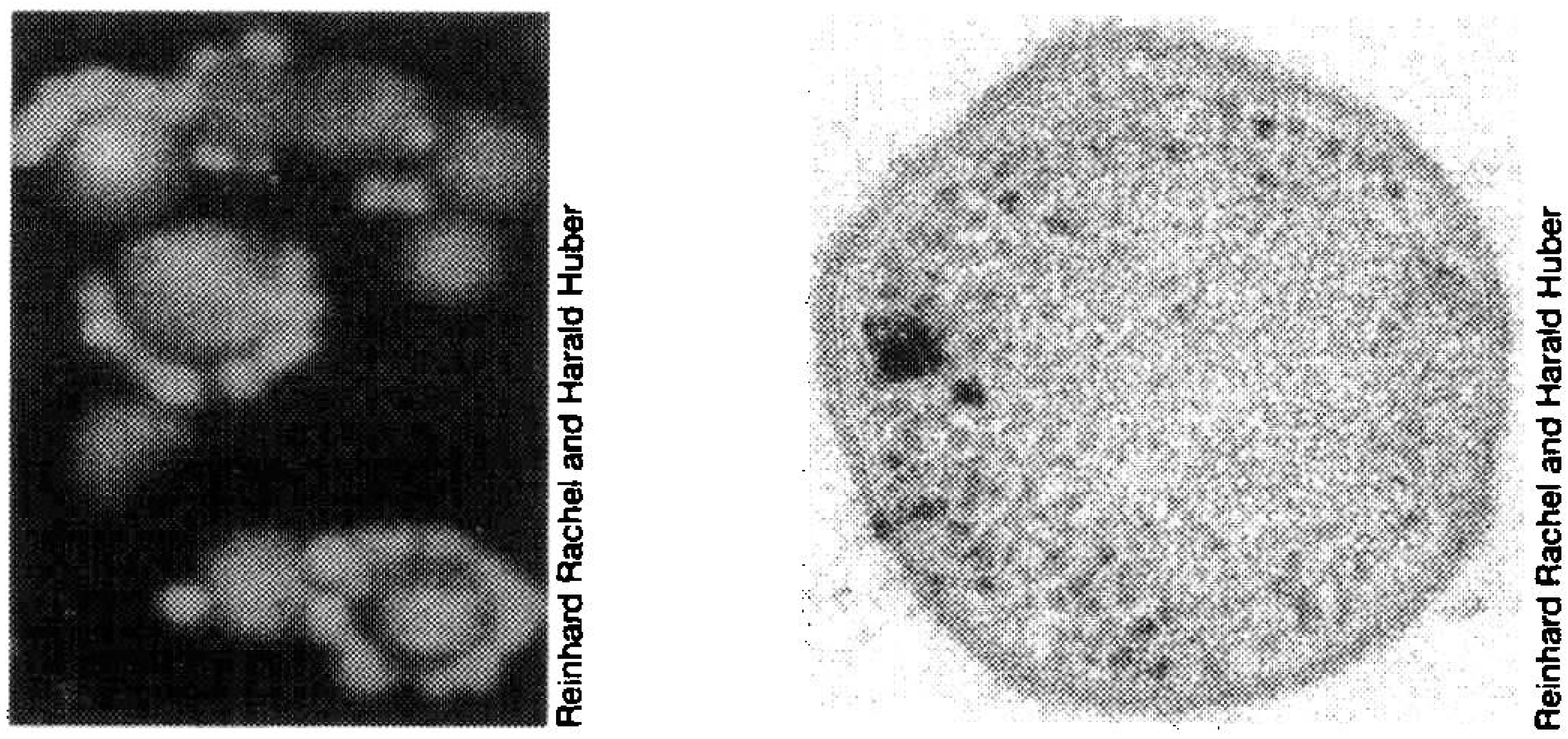
◆ 以 H_2 为电子供体的生物属于哪一能级的生物？请列出泉古生菌中可利用 H_2 的属，并列出它们的电子受体。

Ⅳ 纳米古生菌门

纳米古生菌门（Nanoarchaeota）是古生菌中一个独特的门，其包括微小的寄生性细胞。这些神奇的原核生物有许多惊人的地方，已知的最小基因组的原核生物就属于纳米古生菌门。

13.11 纳米古生菌属

纳米古生菌属（*Nanoarchaeum*）的细胞为非常小的球形，寄生或共生于泉古生菌的火焰球菌（见 13.10 节）。纳米古生菌属细胞的直径大约 0.4μm，其体积只有大肠杆菌细胞的 1%。只有当纳米古生菌属细胞附着在火焰球菌细胞的表面上，纳米古生菌属细胞才开始进行复制。纳米古生菌属细胞可以单独的、成对的或十几个一起附生在一个火焰球菌细胞上（图 13.22a）。纳米古生菌属细胞的细胞壁由一层表面层蛋白（S-layer）组成（见 4.10 节），表面层蛋白下面像是细胞的周质空间（图 13.22b）。



(a)　　　　(b)

图 13.22　纳米古生菌属。（a）纳米古生菌属（*Nanoarchaeum*）细胞（红色）附着于火焰球菌（*Ignicoccus*）细胞（绿色）的荧光显微照片。用特异核苷酸探针靶定于相应的细胞，通过荧光原位杂交（FISH）将细胞染色（见 11.7 节）。（b）纳米古生菌属细胞薄切片的透射电镜照片。注意其独特的细胞壁。纳米古生菌属细胞直径约 0.4μm。

纳米古生菌属细胞不能被纯培养，它们必须以火焰球菌细胞为宿主。然而，并不清楚火焰球菌细胞是否从这种依附关系中受益。纳米古生菌属具有超嗜热性，其最适的生长温度约为 90℃。关于纳米古生菌属的代谢类型还不清楚，但其宿主是以 H_2 为电子供体、以 S^0 为电子受体的自养生物。从海底热水流火山口和陆地热泉中都分离到了纳米古生菌属，看来纳米古生菌属分布在世界各地适宜的超热栖息地。目前，只了解纳米古生菌属一个种——骑火球纳米古生菌（*Nanoarchaeum equitans*）。

纳米古生菌属的系统发育及其基因组

纳米古生菌门在古生菌中代表一种特殊的谱系，与其他门都不相同（图 13.1）。由于纳米古生菌门的 16S rRNA 非常独特，所以在界定纳米古生菌门的系统发育地位时碰到了难题。纳米古生菌属的 16S rRNA 包含了很多可替代碱基，在相对于其他古生菌来说是高保守的区域内也是如此。实际上，从其他古生菌中可扩增（使用 PCR 方法）16S rRNA 基因的多核苷酸引物，并不能从纳米古生菌属中扩增出 16S rRNA 基因。

纳米古生菌属的基因组只有 0.49Mb，是目前已知的最小的基因组。令人惊讶的

是，纳米古生菌属的基因组缺少很多与代谢功能有关的基因，包括合成氨基酸、核苷酸及辅酶等单体的基因。纳米古生菌属的基因组也缺少编码分解代谢途径中（如糖酵解途径）相关蛋白质的基因。据推测，这些功能可能由纳米古生菌属的宿主——火焰球菌属来执行。纳米古生菌属含有编码 ATP 酶的部分基因（见 5.12 节），所以，并不清楚纳米古生菌属是否具有 ATP 酶功能。如果没有 ATP 酶，就不可能存在底物水平磷酸化，那么纳米古生菌属的能量和碳源都可能依靠其宿主火焰球菌。纳米古生菌属寄生于火焰球菌主要是由于代谢的需要，就像立克次氏体（*Rickettsia*）和衣原体（*Chlamydia*）感染人类作为宿主一样。

纳米古生菌属细胞缺少了这么多基因，那么它还剩有哪些基因呢？纳米古生菌属细胞具有“核心”分子过程——DNA 复制、转录、翻译中关键酶的基因。尽管纳米古生菌属的基因减少了很多，但它仍未丢弃（作为一个细胞也不可能丢弃）分子生物学中心法则：DNA→RNA→蛋白质过程中的必需基因。纳米古生菌属的基因组除了“最小”外，其基因密度也是已知最紧密的。纳米古生菌属 95%以上的单环状染色体都编码蛋白质。

纳米古生菌属及其进化

在进化上，纳米古生菌属的哪一点符合原核生物呢？纳米古生菌属位于古生菌进化树的最根部（图 13.1），至少说明它还属于古生菌。然而，纳米古生菌属是否总是寄生性的？据推测不是的，因为那样的话，则有比纳米古生菌属起源更晚、自由生长的宿主已经为它的寄生而存在了。不管纳米古生菌属的祖先是不是自由生存的原核生物，今天我们仍为它极小的细胞个体和基因组而惊异。很明显，纳米古生菌属在细胞体积和遗传能力方面都已达到或接近了生命的临界点。实际上，可自我复制、比纳米古生菌属所含基因更少的就只有病毒了，但病毒不是细胞。目前，对纳米古生菌属进化的最好概述为：纳米古生菌属是超嗜热菌、在古生菌早期分枝出来、最后演变成寄生的存在形式。目前已知的纳米古生菌都不能独立生活，因此可暂且将寄生性作为纳米古生菌门的一个标志特征。

概念检查

纳米古生菌属是很小的、寄生性的、进化分枝较早的古生菌成员。其基因组是所有已知生物中最小的。纳米古生菌属缺少很多基因，但具有核心分子过程的基因，因此，细胞的很多方面都依赖于宿主——火焰球菌。

- 从进化的角度讲，纳米古生菌属的哪些方面非常有趣？
- 如何知道纳米古生菌属具有超嗜热性？

V 高温环境中的生命及其进化

超嗜热古生菌的生长温度远高于其他原核生物生长的温度。忍受高温的机制是什么？生命可存在的温度极限到底是多少呢？这些答案将会为地球早期的历史提供线索。

13.12 生物分子的热稳定性

超嗜热菌的蛋白质和 DNA 保持稳定对于其在高温下生存至关重要。大多数蛋白质在高温下变性，所以很多研究对热稳定蛋白的特性进行鉴定。蛋白质的热稳性溶液呈现出分子的折叠。对核苷酸来说，温度是一个因素，并且在超嗜热菌体内形成的独特溶液可以保持 DNA 完整。

蛋白质的折叠及其热稳定性

超嗜热菌热稳定蛋白的氨基酸组成并没有什么特殊。实际上，超嗜热菌的酶的初级和高级结构与嗜温细菌的热不稳定蛋白都具有相似的结构特征（见 3.6 节～3.8 节）。然而，热稳定蛋白质的其他特征可增强热稳定性。这些特征包括高度的疏水核心（阻止蛋白质折叠被打开），以及很多离子作用于蛋白质表面（有助于使蛋白质聚集在一起而不被打开）。最终，蛋白质自身的折叠使其具有抗热性。有趣的是，氨基酸序列微小的变化往往足以引起分子折叠的明显改变，从而影响蛋白质的热稳定性。

伴侣蛋白：辅助蛋白质仍处于天然状态

在第 7 章我们讨论了一系列被称为伴侣蛋白（chaperonin）[热激蛋白（heat-shock protein），见 7.17 节] 的蛋白质，其对变性的蛋白质有重新折叠的功能。超嗜热的原核生物也产生一系列特异的伴侣蛋白，但只有达到其最高生长温度时才发挥功能。如在热网菌属（图 13.23）细胞内，主要的伴侣蛋白是一种称为热聚体（thermosome）的蛋白质复合物。这种复合物的功能是保持细胞其他蛋白质的正确折叠，并在高温时发挥功能，协助细胞在超出最高生长温度时存活下来。例如，热网菌属细胞在接近其最高生长温度（110℃）时产生大量的热聚体蛋白。正是如此，细胞经受热激甚至 1h 的高压锅（121℃）处理后仍具有活性。当细胞经受这样的热处理再置于最适的生长温度下时，这些热稳定性非常好的热聚体将很多关键的变性蛋白质重新折叠足够多的拷贝数，这样，

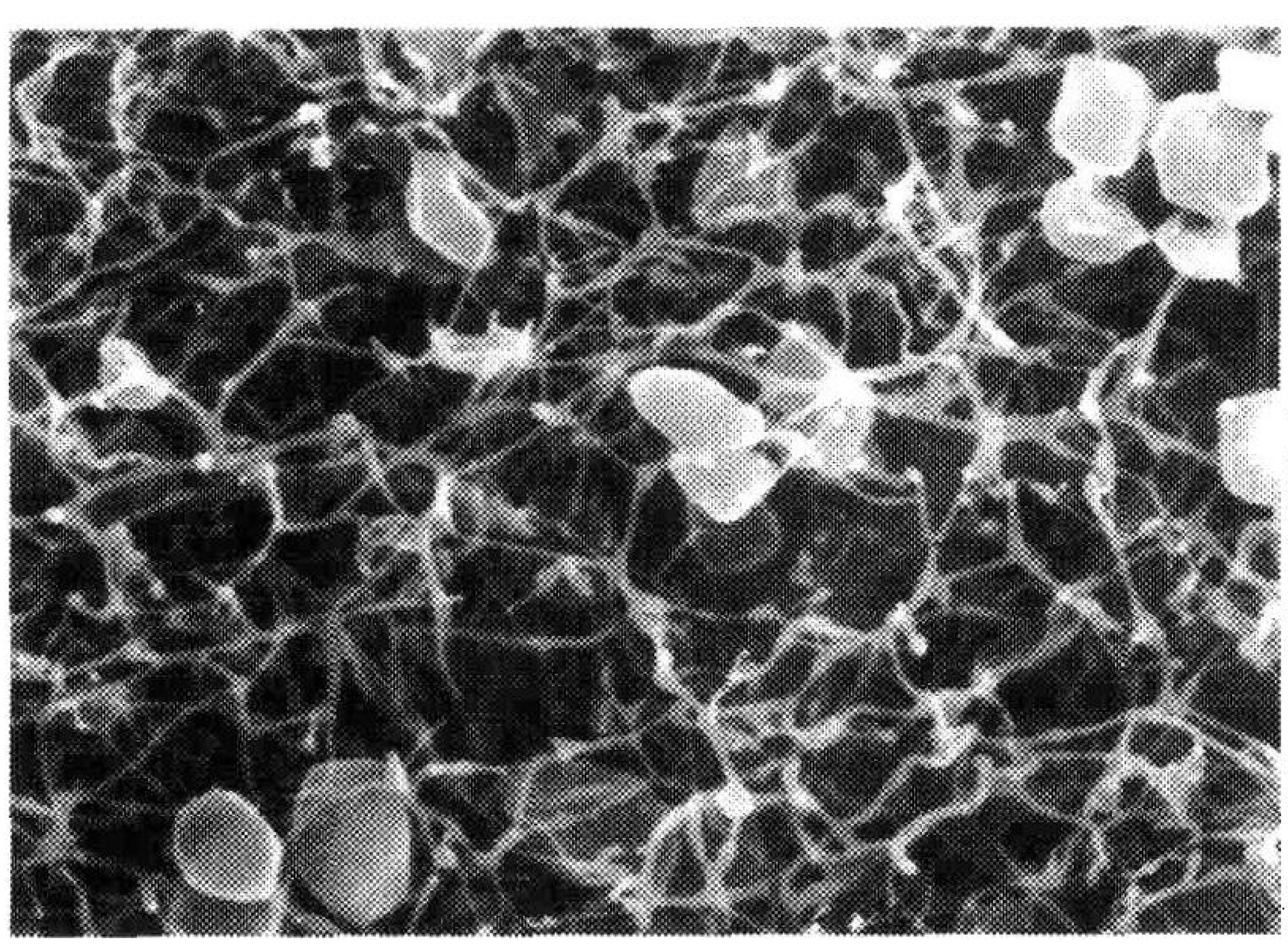


图 13.23　热网菌（*Pyrodictium abyssi*）的扫描电镜照片。热网菌属（*Pyrodictium*）是研究微生物大分子在高温下热稳定性的模型。黏性的糖蛋白特质将细胞之间连成网状。

热网菌属就可继续生长并进行裂殖。因此，由于伴侣蛋白的活性，很多超嗜热菌的最高生长温度低于其最高存活温度。这种“保险网”保证细胞经受短暂的最高生长以上温度的热激后不被杀死。

高温下的 DNA 稳定性：溶质及反向促旋酶

DNA 如何在高温下保持完整而不融化？这个过程可能包括很多的机制。其中一种机制是增加细胞溶质水平。前面曾提到，超嗜热产甲烷菌如甲烷火菌属（见 13.6 节）的细胞质含有大量环式 2,3-二磷酸甘油酸钾。这种溶质可防止 DNA 在超高温下的化学损伤，如脱嘌呤或脱嘧啶（通过水解糖苷键丢失核苷碱基）。这些化学变化能诱发突变（见 10.2 节）。并非所有的超嗜热菌都产生这种溶质，这说明还存在其他保持 DNA 稳定的机制。

从超嗜热菌中发现了一种独特的蛋白质，据推测这种蛋白质是原核生物中 DNA 不被融化的主要原因。所有的超嗜热菌产生一种 DNA 拓扑酶，称为反向 DNA 促旋酶（reverse DNA gyrase）。反向促旋酶可将正超螺旋引入 DNA（所有非嗜热的原核生物的 DNA 旋转酶引入的都是负超螺旋，见 7.3 节）。正超螺旋能使 DNA 抗热并有效地防止 DNA 螺旋变性。由于在最适生长温度低于 80℃的生物中并没发现反向促旋酶，说明反向促旋酶对 DNA 的热稳定性非常重要。

DNA 稳定性：DNA 结合蛋白

除了盐分和反向 DNA 促旋酶外，超嗜热菌的其他蛋白质也有保持双螺旋 DNA 完整的功能。例如，在硫化叶菌细胞内存在一种小的热稳定结合蛋白，其非特异地结合于 DNA 的小沟（图 7.5），可使 DNA 的融解温度提高 40℃。这种和 DNA 结合非常紧密蛋白质被称为 Sac7d，因而可能也参与基因的调控（转折 DNA，见 8.4 节）。

广古生菌中也含有 DNA 结合蛋白。与 Sac7d 不同的是，这些 DNA 结合蛋白属于高碱性蛋白，与真核生物核组蛋白的氨基酸序列有很高的同源性以及相似的折叠特征（见 7.3 节）。超嗜热产甲烷的炽热甲烷嗜热菌（*Methanothermus fervidus*）的古生菌组蛋白（archaeal histone）被研究的比较深入。这种组蛋白与 DNA 紧密缠绕形成类核小体结构（图 13.24）（见 7.3 节）。这种结构可在高温下维持 DNA 的双链结构。包括极端嗜盐的古生菌，如盐杆菌属在内的大多数广古生菌都含有古生菌组蛋白。由于极端嗜盐菌并不耐热，所以古生菌组蛋白除了能保持 DNA 稳定外，也可能有其他的功能，如调控基因表达等。

脂质的稳定性

细胞脂质的情况如何？超嗜热菌如何防止膜在高温下不分离？基本上所有超嗜热菌的脂质都由二双植烷四醚组成（见 4.5 节这些脂质的结构）。二双植烷四醚脂质对热很稳定，因为植烷单位间的共价键形成一个脂单层（monolayer）膜结构而不是一般的脂双层（bilayer）（图 4.19）。高温能使脂肪酸组成的双层膜结构破坏，但这种由共价键连成的脂单层膜结构对高温却具有稳定性。

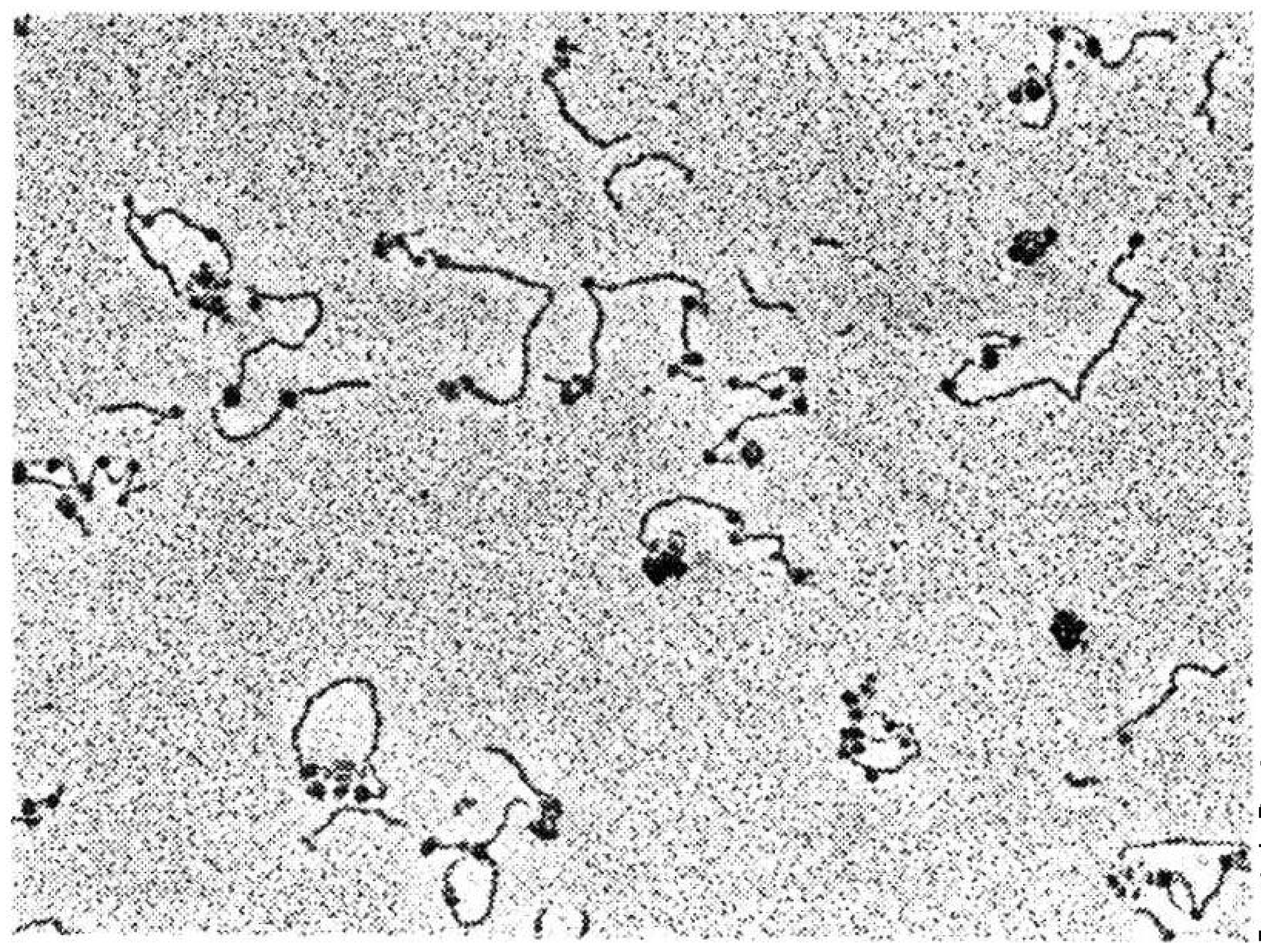


图 13.24　古生菌组蛋白及核小体。线型质粒 DNA 被多拷贝的古生菌组蛋白 Hmf [来源于超嗜热产甲烷的炽热甲烷嗜热菌（*Methanothermus fervidus*），见图 13.8c] 缠绕形成球状，黑色表示核小体结构（箭头）。将这张电镜照片和图 7.9 描述的真核生物的组蛋白及核小体对比。

单体的稳定性

除了大分子（macromolecule）的稳定性外，单体（monomer）的热稳定性也是控制超嗜热菌最高生长温度的重要因素。不管大分子多么稳定，如果基本构件自身不稳定，生命也不可能存在。实际上，是小分子的热稳定性而不是大分子的热稳定性决定了生命的高温极限。

在 120℃时，一些主要的小分子很快被破坏。例如，能量代谢的关键分子 ATP 和 NAD^+（见第 5 章）在这个温度很快水解。在体外（*in vitro*），ATP 和 NAD^+ 在 120℃下的半衰期低于 30min，高于 120℃时半衰期会更短（注意，这种测量是在水中进行的，由于细胞中还存在未被发现的热稳定因子，这些分子在细胞质的稳定性会更高）。那么，120℃就是生命的上限了吗？尽管细胞内小分子的稳定性面临这样的困难，生命的上限温度可能仍会高于 120℃。

微生物生存的温度极限

由于生命依赖于液态的水，所以高于 100℃的微生物栖息地只存在于海底等有压力的环境。实际上，所有能够生长在 100℃以上的超热古生菌似乎都被限制于这种超热的环境（表 13.9）。这些环境支持生命存在的最高温度是多少呢？有资料显示热网菌属的一个新种可在 121℃生长。因此，尽管延胡索酸火叶菌的最高生长温度（113℃）非常显眼，其并不是生命的上限温度。

深海热水流火山口的“黑烟”为天然的超热环境及其内的微生物提供了条件。黑烟释放出 250～350℃的超热液体，液体中的金属硫化物形成竖直的金属性的结构——“烟囱”（图 19.19）。从“烟囱”壁上已分离到几种超嗜热菌：热网菌属、甲烷火菌属

及火叶菌属。烟囱壁由内到外以2℃为单位形成250～350℃的温度梯度，而这些生物只存在最接近其最适生长温度的区域。研究发现，这些超热的水无法孕育生命，这与大分子和小分子在这样的温度下很快被破坏的测量结果相符合。

在实验室条件下，通过对生物分子的稳定性试验显示，140～150℃差不多已是生命的最高极限。高于这个温度，生物就不能解决关键分子的热稳定问题，如ATP在150℃很快被降解。因此，生物要在150℃或更高温度生长，其能量来源应基于其他物质而不是ATP。这一方面的问题不能靠进化来克服吗？现在确定此问题为时过早。然而，如果有一天发现了能生长在150℃或更高温度的超嗜热菌，那么将会揭示出基本原则全新的生物学及生物化学原理。

13.13 超嗜热古生菌、H_2和微生物的进化

为什么这么多的古生菌栖息于极端的环境？尽管对非极端环境（如土壤和水）的分子探测显示古生菌存在于我们周围（甚至在我们体内，如人的大肠存在产甲烷菌），但理论上仍认为所培养的古生菌适应极端环境。直到我们从海洋或土壤里培养出特殊的古生菌，我们才能确定地说“嗜极”是古生菌的特点，但我们姑且这样认为。这对地球及其进化说明了什么呢？

地球早期各种各样的极端环境和现在的极端环境一样，正是在那样的极端环境里繁殖着最早的生命。40亿年前的细胞时代，地球的温度要比现在高得多（见11.1节），因此只适合超嗜热菌生存。那么，这些超嗜热菌是早期生命形式的遗迹吗？下面我们看看古生菌的系统发育树能提供超嗜热菌的哪些情况。

超嗜热菌及其缓慢的进化钟

rRNA基因的分子测序显示，超嗜热古生菌的进化速率比其他生物要慢（图13.1）。超嗜热的细菌如栖热袍菌属（*Thermotoga*）和产液菌属（*Aquifex*）（图12.1）与超嗜热古生菌的进化速率类似。通过观察发现，进化树上超嗜热菌的进化枝都比较短，并靠近根的底部，因此得出以上推论（图12.1和图13.1）。

超嗜热菌的高热栖息地可解释为什么它们会有如此缓慢的进化钟。生活在高温下的生物由于各种限制必须维持其关键的特征。自发突变引起的氨基酸序列的任何改变都不能降低其热稳定性。否则，突变就属于致死性突变。而对于生长在非极端环境的生物，这些压力就不会成为蛋白质多样性的控制因素。换句话说，超嗜热菌的进化限于一定的范围之内，因为在试图获得其他适应性的时候，都必须保持细胞所有分子的热稳定性。如果正像预言的那样，生命起源于炽热的地球，那么今天这些超嗜热的古生菌和细菌应最接近原始的生命形式。因此，这些超嗜热的生物不但有趣，而且是我们了解过去的一个窗口。

氢（H_2）是最原始的能源

在结束这章之前，我们必须指出生物早期生命形式的最后一个线索。注意H_2代谢多次进入超嗜热原核生物的代谢图，尤其是生长在最高温度下的生物（图13.25）。很

多厌氧生长的超嗜热菌以 H_2 为电子供体，以 S^0、NO_3^-、Fe^{3+} 或 O_2 为电子受体（表13.8）。H_2 代谢可能是原始代谢模式生理上的遗留。这些模式可能进化成原始的生命，因为原始环境中的 H_2 和无机的电子受体已经存在并可被利用，而且 H_2 代谢在生化中属于相对简单的过程（图11.6）。

图13.25展示了原核生物生长的上限温度，包括了生物的3种营养方式。很明显，光营养方式对热最敏感，我们可以推测到，其主要原因是光合磷酸化作用中大多的蛋白质复合物对热不稳定（图17.15）。化能有机营养型的最高温度至少110℃，这是隐蔽热网菌生长的最高温度，隐蔽热网菌可发酵一些有机物，在有 H_2 和 S^0 作为电子受体时能以化能无机营养方式生长（表13.9）。在110℃以上，只存在氧化 H_2 的古生菌，包括火叶菌属和热网菌属的一个种，这个种将 H_2 的氧化与 Fe^{3+} 的还原相偶联（表13.9及图13.25）。尽管分析热水流火山口的样本发现，古生菌生存的水温高于120℃，然而从未培养出过这些生物。

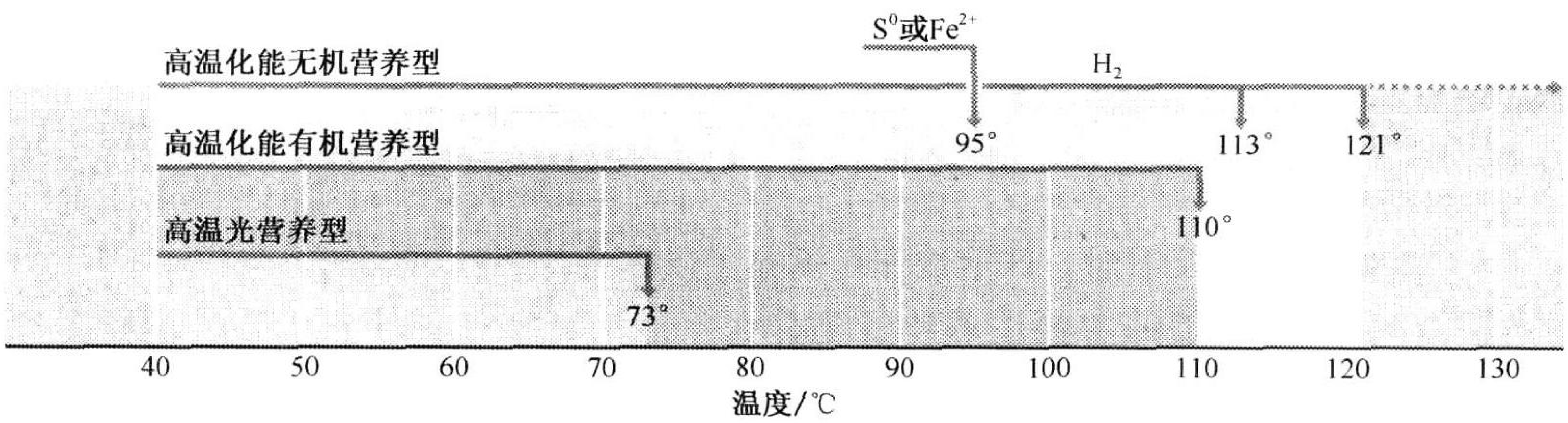


图13.25 能量代谢的温度上限。光营养，蓝色聚球蓝细菌（*Synechococcus lividus*）（细菌，蓝细菌）；化能有机营养，隐蔽热网菌（*Pyrodictium occultum*）（古生菌）；化能无机营养，以 S^0 为电子供体，下层酸菌（*Acidianus infernus*）（古生菌）；化能无机营养，以 Fe^{2+} 为电子供体，铁球菌（*Ferroglobus placidus*）（古生菌）；化能无机营养，以 H_2 为电子供体，延胡索酸火叶菌（*Pyrolobus fumarii*）（古生菌，113℃）；热网菌属（*Pyrodictium* sp.）121菌株（古生菌，121℃）。121菌株也可生长于甲酸盐上，但甲酸盐需经由 H_2+CO_2 代谢。

超嗜热古生菌（以及细菌，见12.5节和12.37节）氧化 H_2 的多样性，说明了氧化 H_2 作为一种代谢方式也在进化。尽管对寄生性纳米古生菌属（见13.11节）的代谢知之甚少，但已知在实验室培养时，H_2 可刺激纳米古生菌属的生长。纳米古生菌属是不是遗传上最简单的氧化 H_2 的原核生物？原核生物中许多系统发育不同的种群、甚至包括生活在地球深处的种群都利用 H_2（见19.4节），说明了 H_2 是一种古老的能源。

大部分超嗜热菌栖息的热水流火山口以及地球地表深处的热地，都可能是出现最早生命的环境。这些环境中含有 H_2、大量无机的电子供体以及电子受体，并且也可避免紫外线的照射。如果这个假说是正确的，那么在本章和第12章讨论的氧化 H_2 的超嗜热菌就可能是地球最早生命的遗迹。

概念检查

尽管超嗜热菌生活在非常高的温度下，甚至超过了水的沸点，它们仍有温度极限，

超过极限的温度下没有生物生存。这个极限为 140～150℃。H_2代谢可能是细胞最早的产能代谢。

◆ 超嗜热菌如何保持蛋白质、DNA 等重要大分子不被高温破坏?

◆ 至少给出两个理由说明为什么生命存在温度上限。

◆ 哪些系统发育和生理学证据支持“广泛的超嗜热菌最接近原始生命”?

复习题

1. 古生菌共有的特征有哪些?(见 13.1 节)
2. 热网菌属、热原体属和甲烷八叠球菌属，哪一个与极端嗜盐的盐杆菌属关系最近?(提示：图 13.1 提供了答案)这些生物各有哪种能量代谢方式?(见 13.1 节和 13.2 节)
3. 盐杆菌属如何在高盐的环境中生存?为什么大肠杆菌不能在高盐中生存?(见 13.3 节)
4. 请比较菌紫红质、盐细菌视紫红质以及盐沼盐杆菌中传感器视紫红质的作用。(见 13.3 节)
5. 当 CO_2被还原为 CH_4时，产甲烷作用的电子供体是什么?(见 13.4 节)
6. 热原体目所有成员的主要生理特征是什么?这一特征如何使它们在矿渣中生存?(见 13.5 节、19.14 节和 19.15 节)
7. 与另一类产甲烷菌甲烷杆菌属相比，甲烷火菌属有哪些生理特征?(见 13.6 节)古生球菌属有哪些独特的生理特征?(见 13.7 节)
8. 泉古生菌存在哪些能量代谢方式?不存在哪些能量代谢方式?(见 13.8 节)
9. 为什么说硫化叶菌是微生物领域具有历史意义的生物?(见 13.9 节)
10. 延胡索酸火叶菌的哪些方面比较特殊?(见 13.10 节)
11. 纳米古生菌属与其他古生菌有哪些相似性?有哪些不同?(见 13.11 节)
12. 什么是反向促旋酶?为什么反向促旋酶对超嗜热菌非常重要?(见 13.12 节)

应用题

1. 用图 13.1 提供的资料讨论为什么菌紫红质是一种晚期的进化产物。
2. 请反驳以下陈述：生命的上限温度取决于蛋白质或核酸等大分子的稳定性。

(蔡 峻 译，杨文博 校)

14

真核细胞生物学和真核微生物



真核细胞包括微生物、植物和动物的细胞。绿藻——杜氏藻属（*Dunaliella*），具有光合营养型真核细胞的典型细胞器，包括膜包围的细胞核，线粒体和叶绿体。

词汇表

藻类（alga，复 algae）：光合营养型真核微生物
变形运动（amoeboid movement）：生物体以细胞质流动进行移动的一种运动方式
壳多糖，几丁质（chitin）：存在于真菌和藻类细胞壁中的 *N*-乙酰氨基葡萄糖的多聚物
叶绿体（chloroplast）：光合营养的真核生物的光合作用细胞器
纤毛虫（ciliate）：以许多被称为纤毛的短的附属物进行快速运动为特征的原生动物
分生孢子（conidia）：真菌的无性孢子
嵴（crista，复 cristae）：线粒体（折叠）的内膜（系统）
细胞骨架（cytoskeleton）：真核细胞典型的细胞支架，以排列的微丝维持细胞的形态
内共生（endosymbiosis）：自由生活的细菌被（真核生物）吞噬后，（在长期的共生过程中）转化为（真核细胞内）产生能量的细胞器
真核（*Eukarya*）：所有的真核生物
真核生物（eukaryote）：真核中的一员
鞭毛虫（flagellate）：以一根或更多的具有类似鞭打功能的鞭毛进行运动的原生动物
真菌（fungus，复 fungi）：具有坚硬的细胞壁、无光合作用的真核微生物
氢化酶体（hydrogenosome）：某些厌氧真核微生物的内共生起源的细胞器，能将丙酮酸氧化为乙酸、H_2、CO_2，同时产生 1 个 ATP 分子
减数分裂（meiosis）：在配子形成时细胞核分裂，双倍体数目的染色体均分成为单倍体数目，分配到配子中的过程
微丝（microfilament）：肌动蛋白的丝状多聚体，有助于维持细胞的形态（见细胞骨架）
线粒体（mitochondria，复 mitochondrion）：真核生物的呼吸器官
有丝分裂（mitosis）：真核细胞在细胞分裂时，染色体复制后均分到每个子细胞的过程
霉菌（mold）：丝状真菌
蘑菇（mushroom）：能产生大的可食用的子实体结构的丝状真菌
细胞核（nucleus，复 nuclei）：含有基因组的细胞器
吞噬作用（phagocytosis）：以部分细胞膜包裹颗粒物并使之进入胞内，所进行的摄食颗粒状食物的一种机制
原生动物（protozoa）：无细胞壁、非光合作用的单细胞真核微生物
核酶（ribozyme）：催化性 RNA
RNA 加工（RNA processing）：前体 RNA 向其成熟形式的转变过程
黏菌（slime mold）：与原生动物相似，非光合作用、无细胞壁、产子实体结构（细胞黏菌），或者为细胞质团（非细胞黏菌）的真核生物
剪接体（spliceosome）：核糖核蛋白复合物，能催化去掉 RNA 初始转录产物上的内含子
孢子虫（sporoza）：不运动、寄生的原生动物
端粒酶（telomerase）：在真核生物染色体末端复制 DNA 的酶复合物
类囊体（thylakoid）：叶绿体内含有光合作用色素的片层膜
酵母（yeast）：单细胞真菌

在这一章里，我们介绍真核微生物的结构、分子生物学、系统发育和多样性。也就是说，在本章将阐明真核细胞生物学的基本原理。这些内容不仅是本学科的基础，而且

会有助于理解本书其余章节中有关微生物学的医药和应用方面的内容。

Ⅰ 真核细胞结构与功能

以下 5 节将探讨真核细胞的结构以及内共生（endosymbiosis）关系（见 11.4 节）中细胞器和细菌（*Bacteria*）的起源关系。

14.1 真核细胞结构和细胞核

图 14.1 显示了一个典型的真核细胞。与原核生物不同之处在于，真核生物有一个膜包围的细胞核（membrane-enclosed nucleus）和一些其他的细胞器，不同的生物体，其细胞器有所不同。例如，线粒体（mitochondria）在真核细胞中几乎是普遍存在的，而有颜色的叶绿体（chloroplast）仅在光合营养的细胞中存在。有些真核细胞有细胞壁（如植物细胞、藻类或真菌），有些则没有（如动物细胞或多数的原生动物）。其他的内部结构主要包括高尔基体（Golgi apparatus）、过氧化物酶体（peroxisome）、溶酶体（lysosome）、内质网（endoplasmic reticula），以及微管（microtubule）和微丝（microfilament）（图 14.1）。还有些真核细胞具有运动性细胞器——鞭毛（flagellum）和纤毛（cilium）。

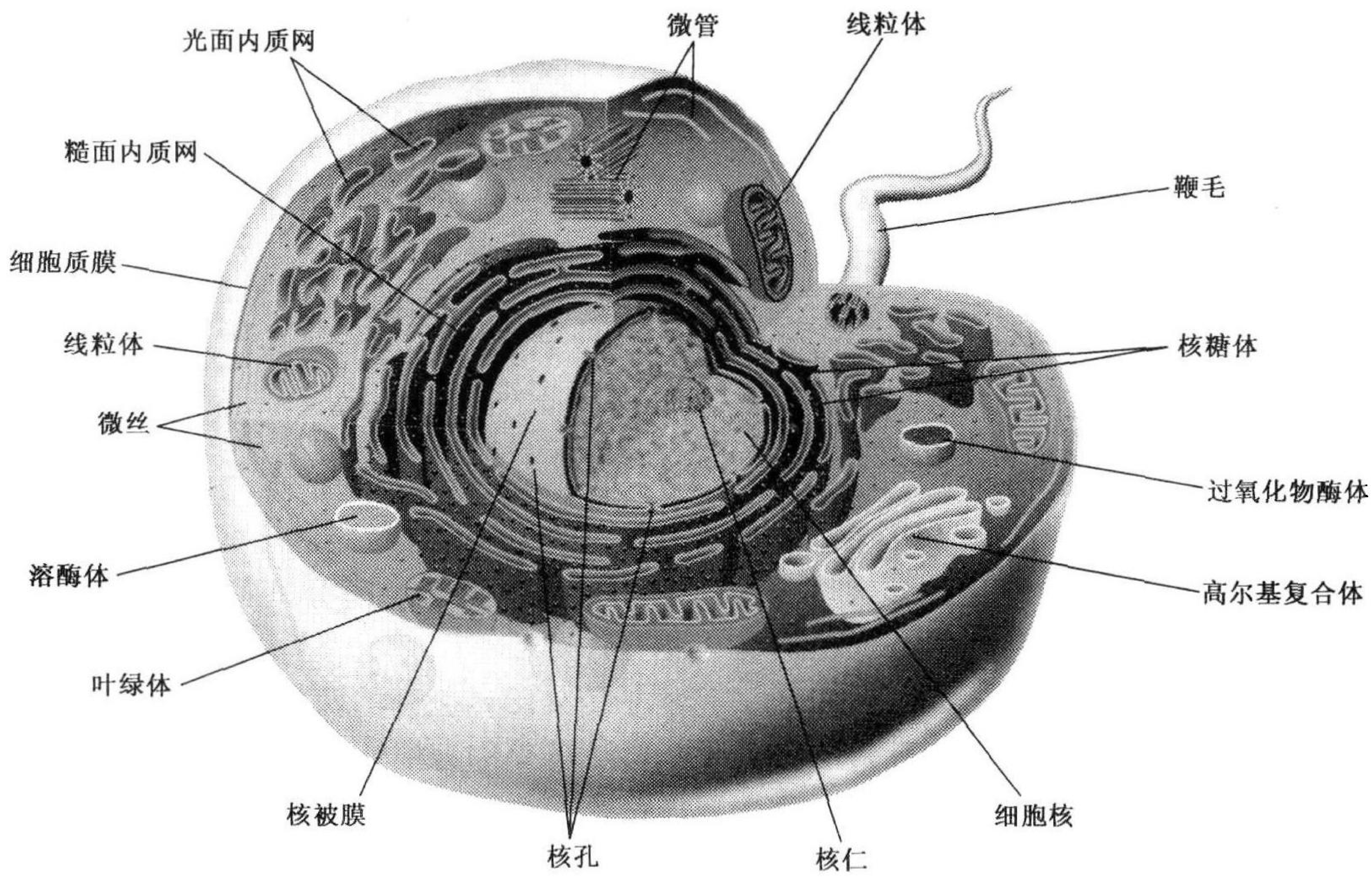


图 14.1　真核细胞的立体剖面模式图。虽然所有的真核细胞都有一个细胞核，但是图中显示的所有的细胞器或其他结构并不存在于所有真核细胞中。

细胞核

细胞核（nucleus）含有真核细胞的基因组（图 14.2）。在真核生物中，细胞核中的 DNA 围绕组蛋白缠绕形成核小体（nucleosome）（图 7.9），核小体（折叠缠绕）形成染色体（chromosome）（图 14.13）。在许多真核细胞中，核的直径达若干微米，甚至于不染色就容易用光学显微镜观察到（图 4.7a）。然而，在较小的真核生物中，常需经过特殊的染色才能观察到核。

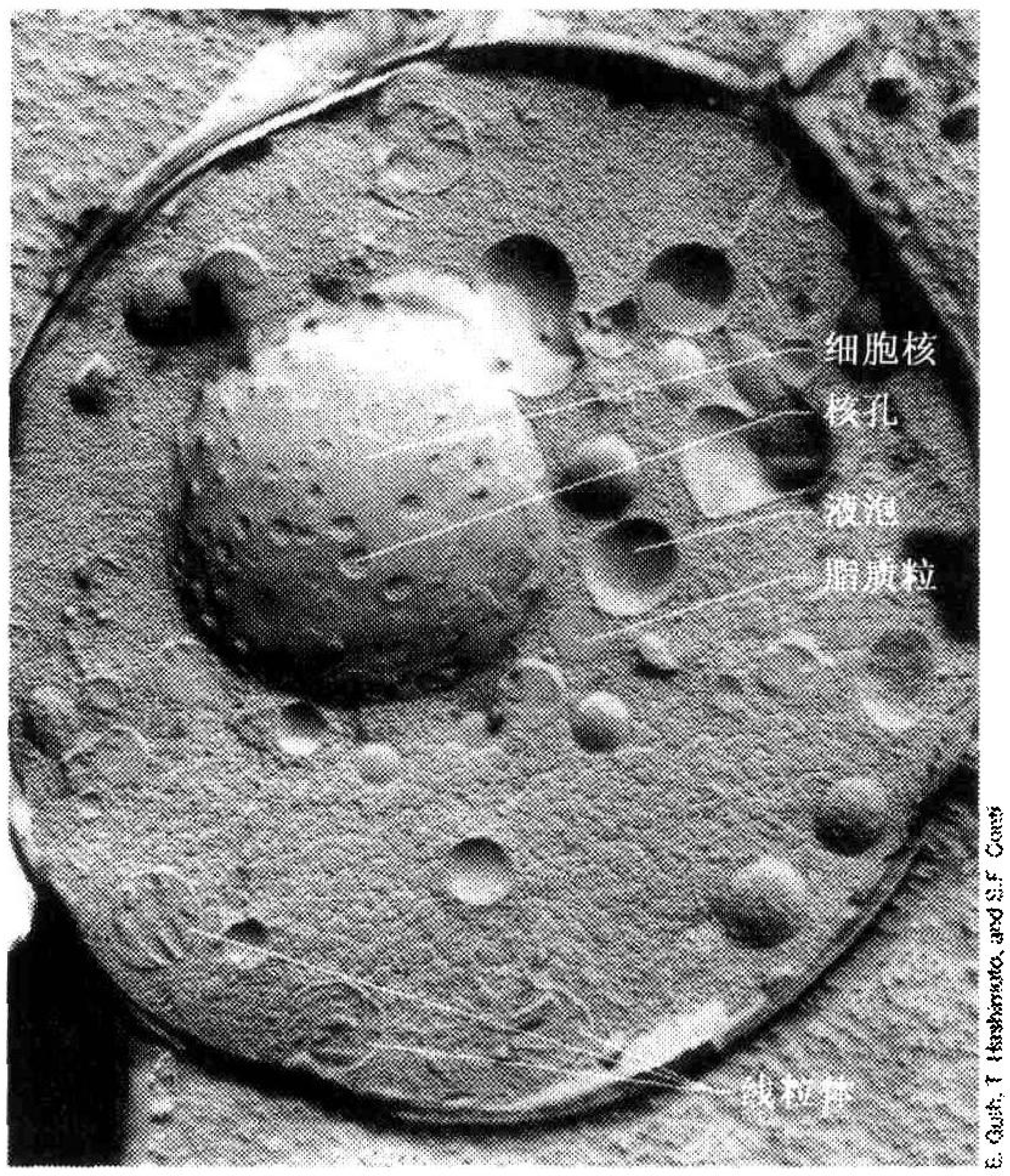


图 14.2 细胞核。酵母细胞冰冻蚀刻技术的电镜照片，显示细胞核表面观。冰冻蚀刻技术是一种透射电子显微镜样品的制备方法（见 4.3 节），标本经冷冻、断裂，超薄切片后在电镜下观察。细胞约 8μm 米宽，细胞核约 1.5μm 宽。

细胞核由一对平行的膜包围着，每层膜有各自的功能，被一定的空间隔开。内膜是一简单的囊（sac），外膜在许多区域与内质网相连。内膜与外膜分别特异性地与核质（nucleoplasm）和细胞质（cytoplasm）发生相互作用。

核膜上有许多孔（pore）（图 14.2），形成于内外膜结合处的两层单位膜中的小洞。蛋白质复合物和核酸通过这些孔进出核内外，这一过程称为核转运（nuclear transport）。与跨越细胞质膜的转运一样，核转运也需要能量，这些能量来自于高能化合物——三磷酸鸟苷（GTP）的水解。

细胞核中的核仁（nucleolus）（图 14.1），是核糖体 RNA 合成的场所，核仁富含 RNA，通常能用光学显微镜观察到。细胞质中合成的核糖体蛋白运输到核仁中，与核糖体 RNA 共同组装成真核生物核糖体的大小亚单位，然后再运回细胞质中组成完整的核糖体，用于蛋白质的合成。

14.2 呼吸和发酵的细胞器：线粒体和氢化酶体

线粒体和氢化酶体专行化能营养的能量代谢。这两种细胞器都由膜包围着，但其功能却大不相同。

线粒体

在需氧真核细胞中，呼吸作用和氧化磷酸化作用（一种生成 ATP 的方式）（见 5.11 节和 5.12 节）定位于线粒体（mitochondria）（单数，mitochondrion）。线粒体与原核生物大小差不多，可以是棒状或近似于球形（图 14.3）。一个典型的动物细胞可含有 1000 多个线粒体，但每个细胞所含线粒体的数量在某种程度上与细胞的类型和大小相关。酵母细胞中的线粒体数目要少得多（图 14.2）。线粒体由两层膜包围，外膜（outer membrane）由等量的蛋白质和脂质混合组成，通透性强，存在很多的微小通道，允许离子和有机小分子通过。内膜（inner membrane）的蛋白质含量比外膜高，因而通透性较低。线粒体膜缺少固醇（见 4.5 节），没有真核细胞质膜（含有固醇）硬，因此线粒体呈现出高度变化的形状（图 14.3b，c）。

线粒体还有一个折叠的内膜系统称为嵴（crista），这些膜是由内膜内陷形成的，是参与呼吸作用及 ATP 生成的酶的位点。嵴上还有特异性运输蛋白，这些蛋白质起调节代谢通道的作用，尤其是调节 ATP 进出线粒体基质（matrix）（图 4.13a）。基质中含有大量参与氧化有机化合物的酶，尤其是参与柠檬酸循环（citric acid cycle）的酶（见 5.13 节）。

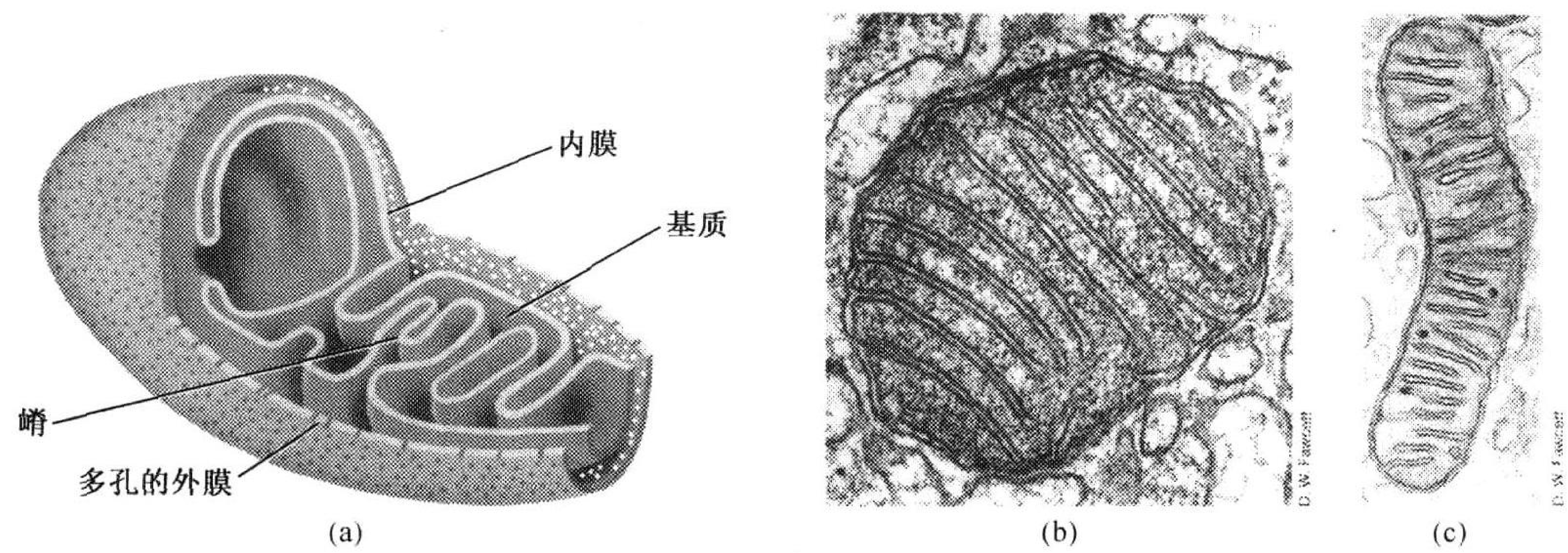
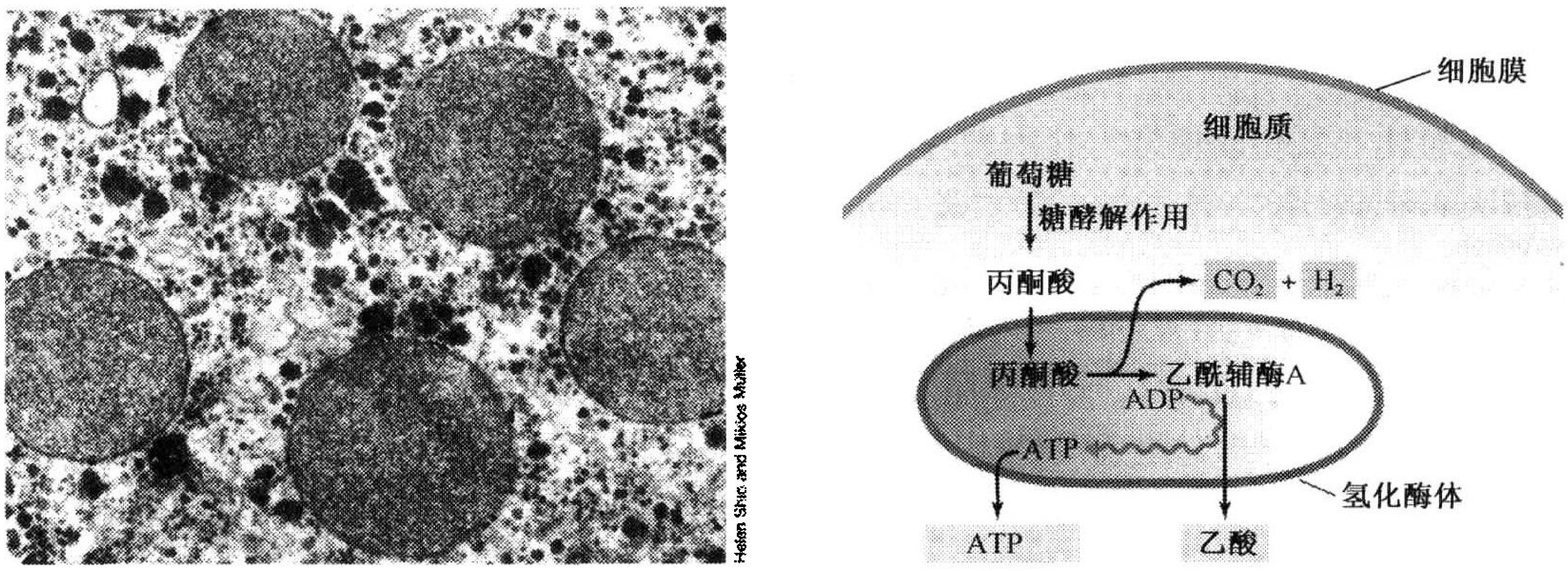


图 14.3　线粒体结构。（a）示意图显示了全部线粒体结构，图中标明内、外膜。（b、c）大鼠组织线粒体的透射电镜照片，显示了线粒体在形态上的可变性，图中标明嵴。

氢化酶体

一些厌氧（anaerobic）真核微生物缺乏线粒体，而含有氢化酶体（hydrogenosome）（图 14.4a）。尽管大小与线粒体相似，但氢化酶体却没有嵴和柠檬酸循环中的酶类。具有氢化酶体的多种真核微生物，不是专性厌氧菌就是耐氧厌氧菌，这些厌氧菌专行发酵代谢。例如，鞭毛虫毛滴虫属（*Trichomonas*）（见 14.10 节）等寄生虫和生活在

反刍动物的瘤胃（见 19.11 节）或缺氧的泥沼和沉积物中的各种有纤毛的原生动物。



(a) (b)

图 14.4 氢化酶体。（a）厌氧鞭毛虫——阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）细胞超薄切片的电镜照片，显示了 5 个氢化酶体的剖面图。注意对比氢化酶体和线粒体（图 14.3b）的内部结构。（b）氢化酶体的生物化学反应。氢化酶体摄入丙酮酸，产生 H_2、CO_2、乙酸和 ATP（均以红色显示）。氢化酶体的主要酶是丙酮酸：铁氧（化）还（原）蛋白-氧化还原酶和氢化酶。内共生的甲烷微生物（见 13.4 节）常存在于具有氢化酶体的真核生物的细胞质中，消耗 H_2 和 CO_2 产生甲烷（图 19.26c）。

氢化酶体中主要的生化反应是将丙酮酸氧化成 H_2、CO_2 和乙酸（图 14.4b）。丙酮酸被氧化成高能量的化合物乙酰辅酶 A（acetyl-CoA）（以此形成乙酸的时候产生额外的 ATP，见 17.19 节），同时释放 H_2 和 CO_2（图 14.4b）。在某些厌氧真核生物的细胞质中，栖息着消耗 H_2 的共生原核生物如产甲烷菌（图 19.25b，c），共生体消耗由氢化酶体产生的 H_2 和 CO_2（图 14.4b），并释放甲烷。因为氢化酶体没有电子传递链和柠檬酸循环，所以它不能像线粒体那样氧化由丙酮酸代谢生成的乙酸，因此乙酸被从氢化酶体分泌到宿主细胞质内（图 14.4b）。

概念检查

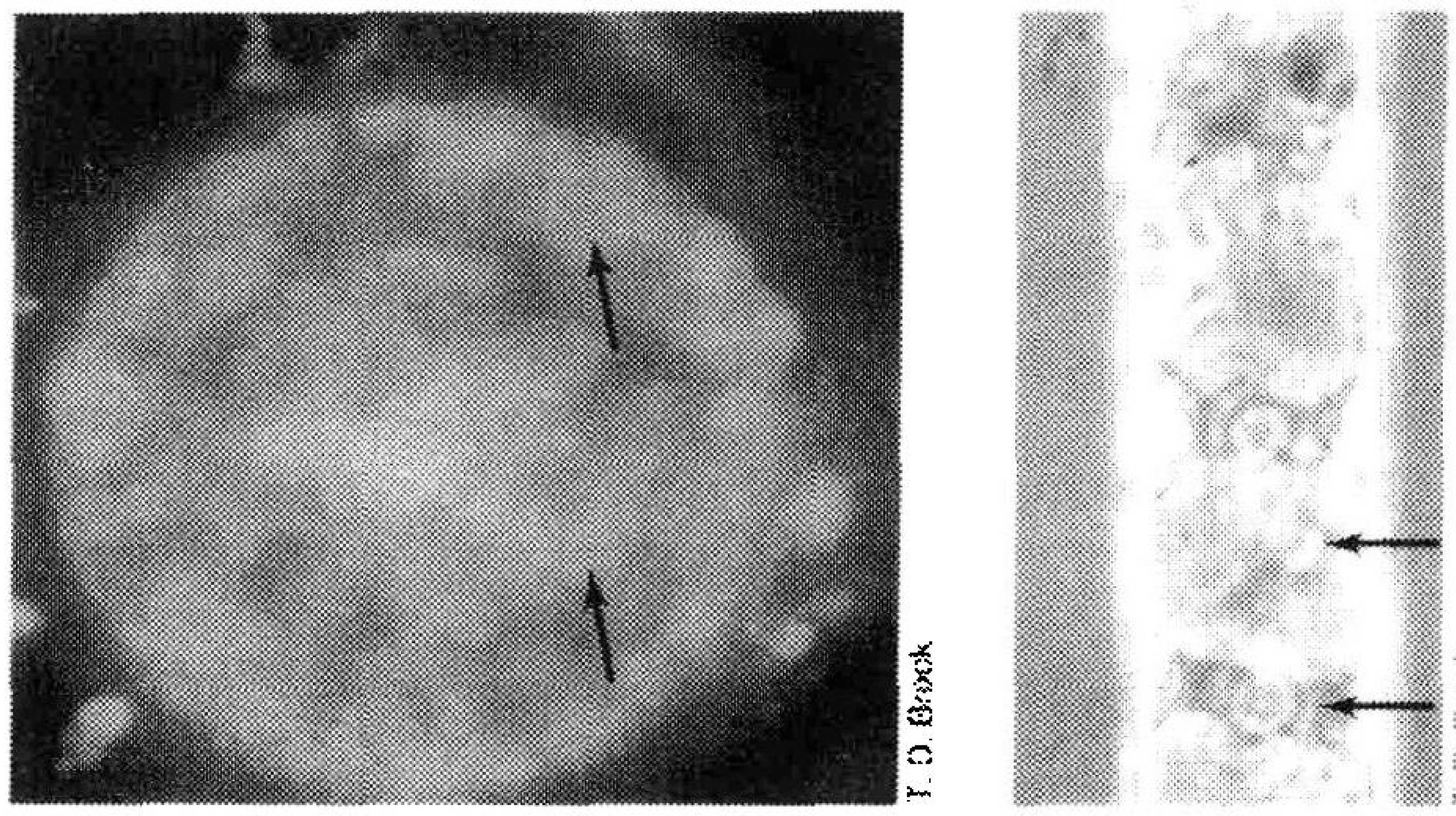
线粒体和氢化酶体是真核细胞的产能细胞器。线粒体与有氧呼吸相关，而氢化酶体仅存在于某些专性厌氧真核生物中，发酵丙酮酸产生 H_2、CO_2、乙酸和 ATP。

◆ 线粒体中发生的主要反应是什么？线粒体为细胞本身提供的主要产物是什么？

◆ 对比线粒体和氢化酶体中丙酮酸的代谢命运。

14.3 光合作用的细胞器：叶绿体

叶绿体（chloroplast）是含有叶绿素的细胞器，存在于能进行光合作用的真核生物——藻类中。许多藻类的叶绿体相当大，用光学显微镜很容易观察到（图 14.5）。叶绿体的大小、形状、数量变化很大，但是与线粒体不同，它们一般比原核细胞要大得多。



(a)　　　　　　　　　　(b)

图 14.5　具有叶绿体的藻细胞显微镜照片。（a）硅藻冠盘藻属（*Stephanodisus*）的荧光显微照片，叶绿体（箭头所示）中的叶绿素吸收光而发红色荧光。（b）水绵属（*Spirogyra*）相差显微照片，显示特异性的螺旋形叶绿体（箭头所示）。

与线粒体相似，叶绿体也有一个可渗透性的外膜，一个渗透性较差的内膜和一个膜间隙。叶绿体的内膜包围着叶绿体腔，这个腔被称为基质（stroma），但并不像线粒体内膜那样折叠成嵴（图 14.3a）。叶绿素和所有其他光合作用的组分都位于一系列称为类囊体（thylakoid）的扁平膜片上（图 14.6）。离子和其他代谢物不能渗透类囊体膜，因为它的功能是形成 ATP 合成所需要的质子动力（见 5.12 节）。在绿藻和绿色植物中，类囊体通常堆叠在一起，成为不连续的结构单位，称为基粒（grana）（图 17.5）。

叶绿体基质中含有大量的核酮糖二磷酸羧化酶（ribulose bisphosphate carboxylase），简写为 RubisCO，这种酶是卡尔文循环（Calvin cycle）中的关键酶。卡尔文循环是大多数光合生物将二氧化碳转变为有机化合物的一系列生物合成反应（见 17.6 节）。RubisCO 占整个叶绿体总蛋白的 50%多，负责催化生成磷酸甘油酸（phosphoglyceric acid）——葡萄糖生物合成中的关键组分（见 5.10 节和 5.15 节）。叶绿体外膜的渗透性使葡萄糖和光合作用中生成的 ATP 扩散到细胞质，用来生成新的细胞物质。

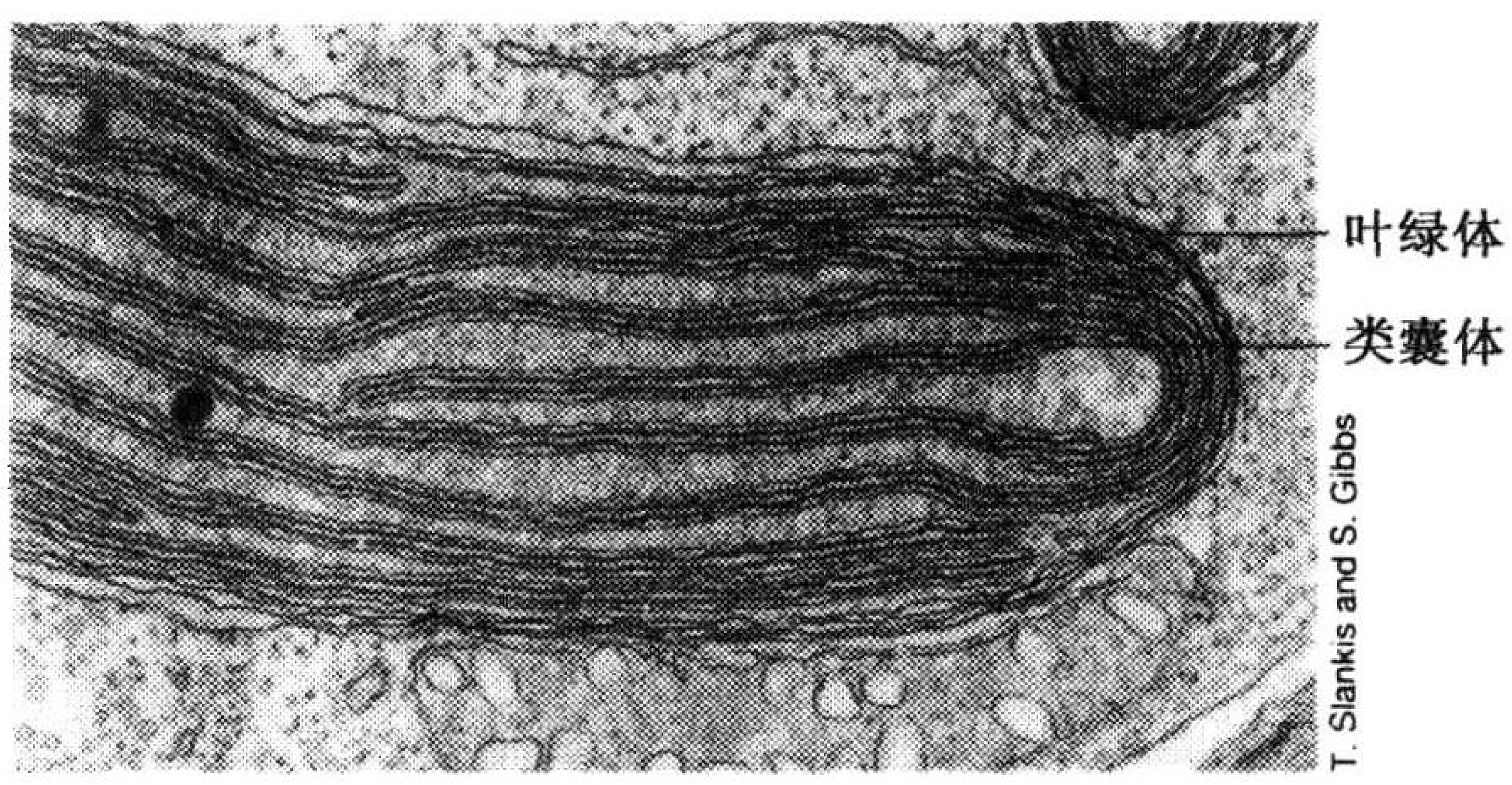


图 14.6　叶绿体。显示金褐藻金黄滴虫（*Ochromonas danica*）叶绿体的透射电镜照片。图中标明类囊体。

概念检查

叶绿体是光合作用产生能量的场所，和真核光养生物中固定 CO_2 的场所。

◆ 基质与类囊体的区别。

◆ RubisCO 有何功能，位于何处？

14.4 内共生：线粒体、叶绿体与细菌的关系

基于线粒体和叶绿体的相对独立性、大小及与细菌形态的相似性，很早以前就认为它们是古代细菌的后裔。内共生（endosymbiosis）学说推测了这些细胞器的形成过程。内共生学说认为一个较大原核细胞（“宿主”）吞噬了一个小的原核细胞，并将这个被吞噬的细胞演变为一个细胞器（见 11.4 节和图 11.9）。分子生物学的一些证据支持内共生理论，在此总结如下：

1. 线粒体和叶绿体含有 DNA

虽然宿主的大部分功能是由核 DNA 编码的，但是少数的细胞器组分由细胞器自身内部的一个小基因组所编码，如 rRNA、tRNA 和（线粒体）呼吸链的某些蛋白质以及光合作用装置（叶绿体）。因此无光合作用的真核细胞是遗传学的嵌合体，含有来自内共生体（endosymbiont）和宿主细胞核（host cell nucleus）这两种不同来源的 DNA。能进行光合作用的真核生物——藻类和高等植物——含有的 DNA 有 3 种不同的来源，即共生的线粒体和叶绿体及细胞核。与多数原核生物一样，大部分的线粒体 DNA 和所有的叶绿体 DNA 以共价闭合环状（circular）形式存在（见 2.2 节、7.2 节和 7.3 节）。通过特殊的染色方法可观察到细胞中的线粒体 DNA（图 14.7）。本书在 15.7 节讨论细胞器基因组的许多其他非常有趣的特性。

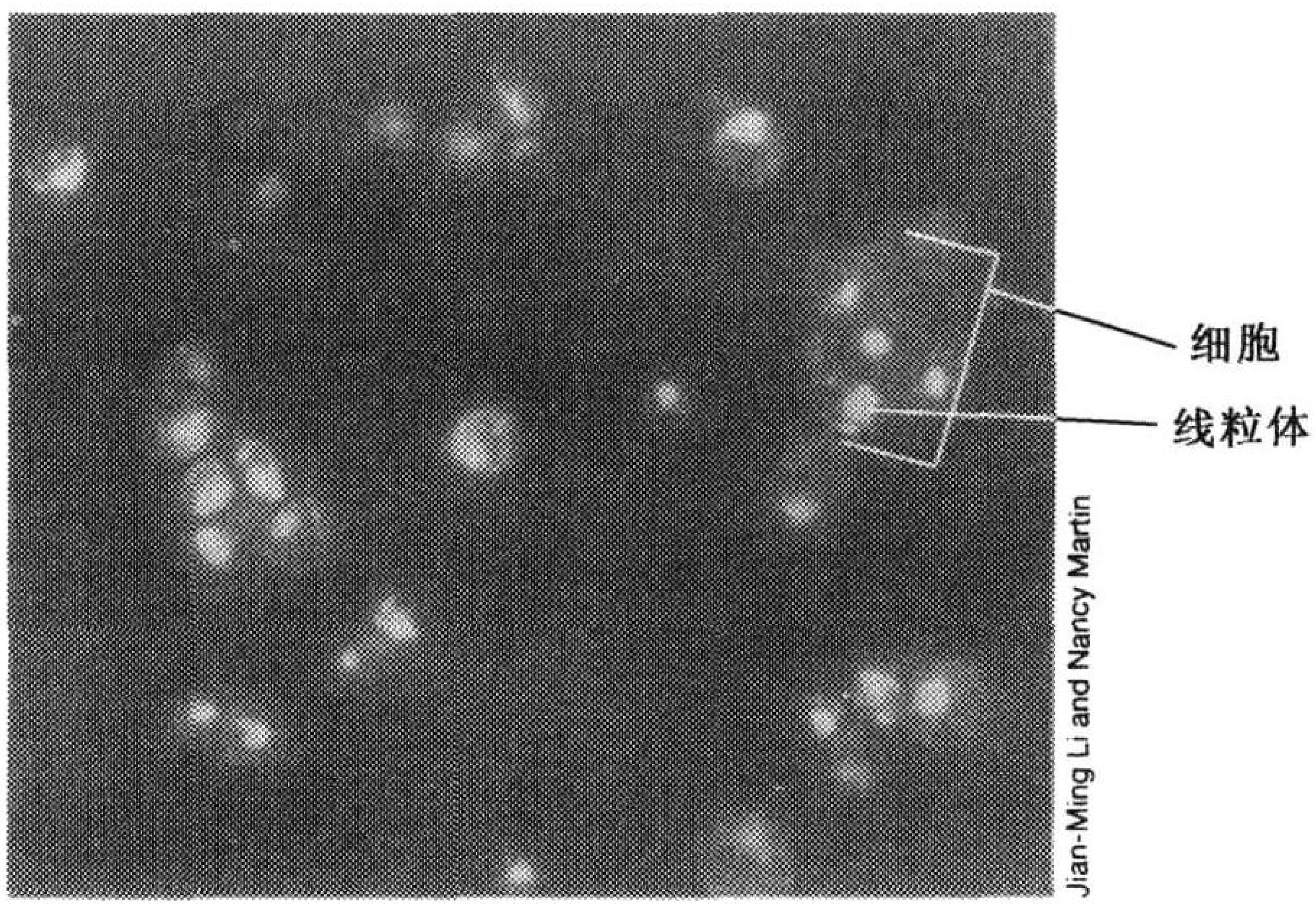


图 14.7　酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的细胞。细胞经 DAPI（4′6′-二联脒-2′-吲哚苯）染色（见 18.3 节），显示线粒体 DNA。每个线粒体有 2～4 个环形的染色体，由荧光染料染成蓝色。

2. 真核生物的细胞核含有细菌来源的基因

基因组测序（见第 15 章）和其他遗传学研究已明确显示某些核基因编码特性不同于细胞器。因为这些细胞器基因的序列与细菌的基因序列更近似，而与古生菌或真核生物的基因序列差异要大些，所以结论是：从最初被吞噬的细胞过渡为现代的细胞器，在这个演变的过程中，这些基因从细菌的共生体转移到细胞核。

3. 线粒体和叶绿体含有本身的核糖体

核糖体是细胞蛋白质合成的场所（见 7.16 节），核糖体或是以典型的真核细胞较大形式 80S 存在，或者是以原核生物中的较小形式 70S 存在。线粒体和叶绿体的核糖体都是 70S，与原核生物的核糖体大小一样。

4. 抗生素的特异性

许多抗生素通过特异地干扰 70S 核糖体的功能来杀死或抑制细菌，如链霉素，也抑制线粒体和叶绿体中的蛋白质合成。

5. 分子系统发育

系统发育研究采用比对 rRNA 的序列（见 11.4 节～11.8 节）和细胞器基因组的结果（见 15.7 节），充分证明了叶绿体和线粒体起源于细菌。因此，至少由两种完全不同的生物体，经内共生过程结合而形成了现代真核细胞（见 11.3 节和图 11.7）。

有充分的证据证明氢化酶体来源于内共生体。例如，在白蚁后肠内生存的专性厌氧有纤毛的原生动物 *Nyctotherus ovalis*（见 19.10 节），缺乏线粒体，而它的氢化酶体被鉴定为含有 DNA 和核糖体。此外，含有氢化酶体的真核生物，其细胞核基因可以编码细菌起源的蛋白质。因此像线粒体一样，氢化酶体也是内共生起源。实际上，氢化酶体被认为是新陈代谢退化的线粒体，在宿主细胞中，以一种厌氧的生活方式，放弃了呼吸，利用丙酮酸酵解作为能量储存的一种方式。氢化酶体中产生的乙酸提供给细胞的能量虽不能与线粒体呼吸获得的能量相匹敌，但要比以乳酸或乙醇作为发酵产物提供给细胞的能量多些（图 14.4b；见 5.10 节和 17.19 节）。因此可以认为线粒体和氢化酶体是功能相关的细胞器，只是以不同的代谢策略产生 ATP 而已。其他的结构称为纺锤体 (mitosome)，存在于一些真核细胞中，可能是更加退化的线粒体，几乎丧失了所有与能量有关的功能（见 14.9 节）。

我们可以看到，多种证据支持细胞器起源于真核宿主细胞摄入的自由活的内共生细菌。在这种和谐的组合下，当共生体接受了这种稳定的，互助的生长环境，宿主细胞就获得永久的专门产生能量的伙伴。事实上，今天，线粒体、氢化酶体或叶绿体在所有真核细胞中存在，足以证明内共生是进化上一个成功的例子。

概念检查

真核生物主要的代谢细胞器是进行光合作用的叶绿体和呼吸发酵作用的线粒体或氢

化酶体。这些细胞器起源于细菌，这些细菌经内共生过程而永久定居在其他细胞内部。

◆ 总结支持细胞器与细菌关系的分子证据。

◆ 为什么对原生动物厌氧性纤毛虫（*Nyctotherus*）而言，拥有氢化酶体比拥有线粒体要更好？

14.5 其他细胞器和真核细胞结构

在真核细胞中存在各种其他的细胞质结构，有内质网、高尔基体、溶酶体、过氧化物酶体及运动器官——鞭毛和纤毛。然而与线粒体和叶绿体不同，这些结构没有 DNA 和核糖体，不是内共生起源。

内质网和高尔基复合体

内质网（endoplasmic reticulum，ER）是与核膜相连的网状膜系统，可分为两类：糙面（rough）内质网，其上附有核糖体；光面（smooth）内质网，没有核糖体（图 14.1）。光面内质网参与脂类的合成和碳水化合物代谢的一些方面，糙面内质网通过它的核糖体活性，成为糖蛋白的主要制造者，同时合成新的膜原材料转运到细胞外，用于细胞分裂前扩大各种细胞膜系统（图 14.1）

高尔基复合体（Golgi complex）与内质网不同，由多层内膜叠而成（图 14.1 和图 14.8），但其功能又与内质网相呼应。在高尔基复合体内，对内质网的产物进行化学修饰和分类。一类为分泌蛋白，如激素或消化酶；一类是在细胞其他膜结构中起作用的蛋白质。高尔基体来源于前高尔基体的分裂，含有各种酶可以分别修饰分泌的蛋白质和膜蛋白（根据其在细胞中的最终部位），这些修饰多涉及糖基化作用（glycosylation）（加糖基，）将蛋白质转化为特异性的糖蛋白。

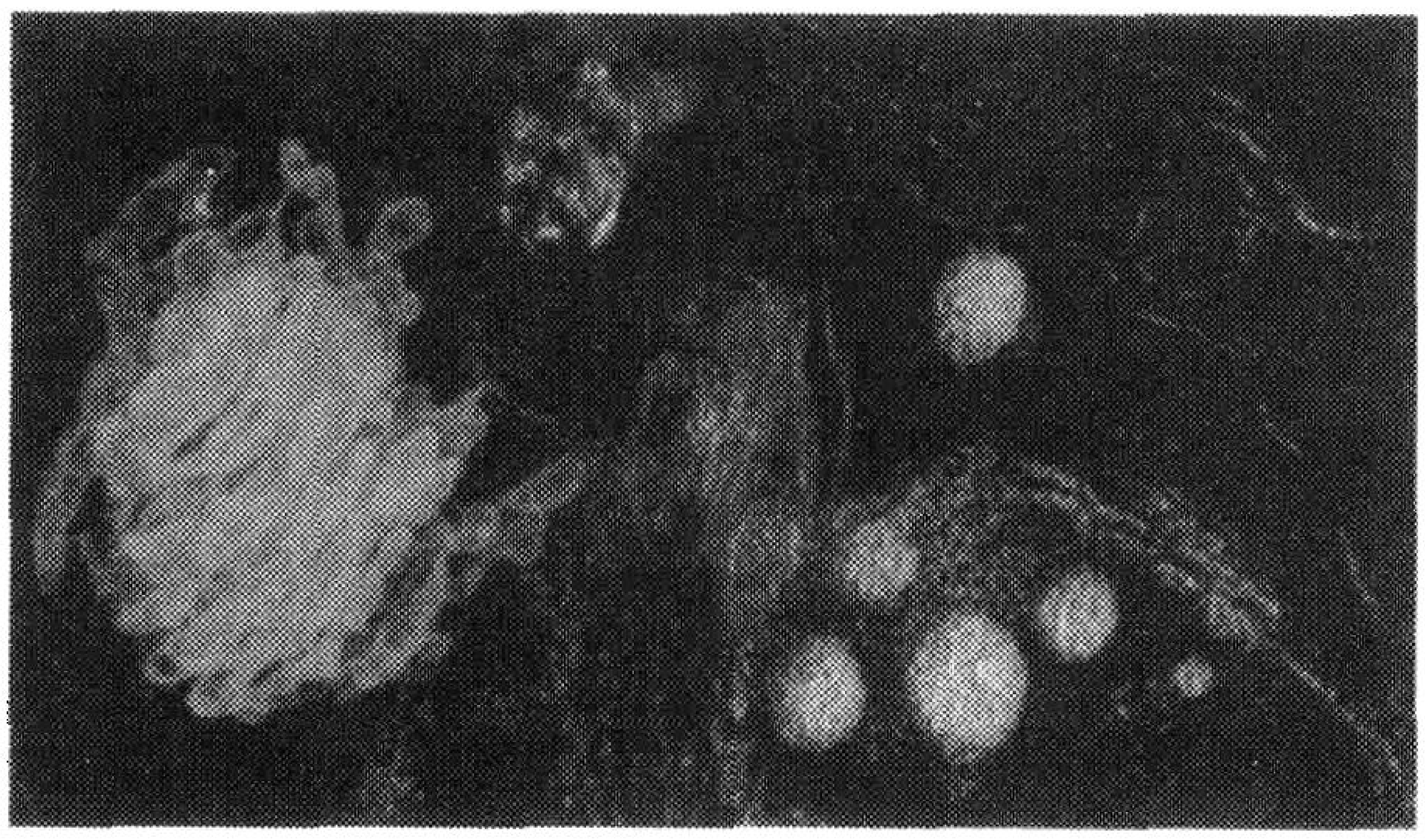


图 14.8 高尔基复合体。原生动物刚地弓形虫（*Toxoplasma gondii*）细胞的部分透射电镜照片。高尔基体为红色。图中标明构成高尔基体的多层堆叠的膜（膜的直径为 0.5～1.0μm）。其他结构如细胞质颗粒以其他颜色显示。刚地弓形虫是研究高尔基复合体的模式生物，因为它的每个细胞只含有一个高尔基体。

溶酶体和过氧化物酶体

溶酶体（图14.1）是由膜包裹的结构，其包含的各种消化酶（digestive enzyme）能分解蛋白质、脂肪、多糖等大分子物质。这样能使细胞循环使用这些原材料用于新的生物合成。溶酶体内部的pH为5，这是溶酶体内水解酶的最适pH，比细胞质的pH要低2个单位。这些水解酶的活性是非特异性的，如果不用膜包围起来有可能毁掉重要的细胞大分子。基于其裂解活性，溶酶体与细胞质隔离开来。随着大分子在溶酶体中被水解，生成的单体从溶酶体转运到细胞质，供给细胞营养。

过氧化物酶体是一个膜包裹的结构（图14.1），其功能是利用各种氢供体，包括乙醇和长链脂肪酸，还原 O_2 产生 H_2O_2。在过氧化物酶体内产生的 H_2O_2 经过氧化氢酶（catalase）催化分解为 H_2O 和 O_2（见6.16节）。过氧化物酶体还有其他功能，如合成胆汁盐（bile salt）帮助吸收和消化脂肪。过氧化物酶体起源于细胞质中蛋白质和脂类的结合，最终演变为一个膜包围的实体，它能与细胞同步扩大和分裂。

微丝和微管

正如房屋通过加固结构来保障稳固一样，真核细胞个体较大，又具运动能力，也需要加固结构。这种内部结构性网络来自蛋白质，它们形成丝状的结构，被称为微丝和微管，两者一起构成细胞骨架（cell cytoskeleton）。

微丝的直径约8nm，是肌动蛋白（actin）多聚体。这些纤维构成贯穿整个细胞的支架，维持细胞的形态（图14.1和图14.9）。微管是更大的细丝，直径约25nm，由微管蛋白（tubulin）组成，协助微丝维持细胞结构。微丝和微管在细胞运动方面起着很重要的作用，包括内部细胞结构的运动（如细胞分裂时染色体的分离），和生物体自身

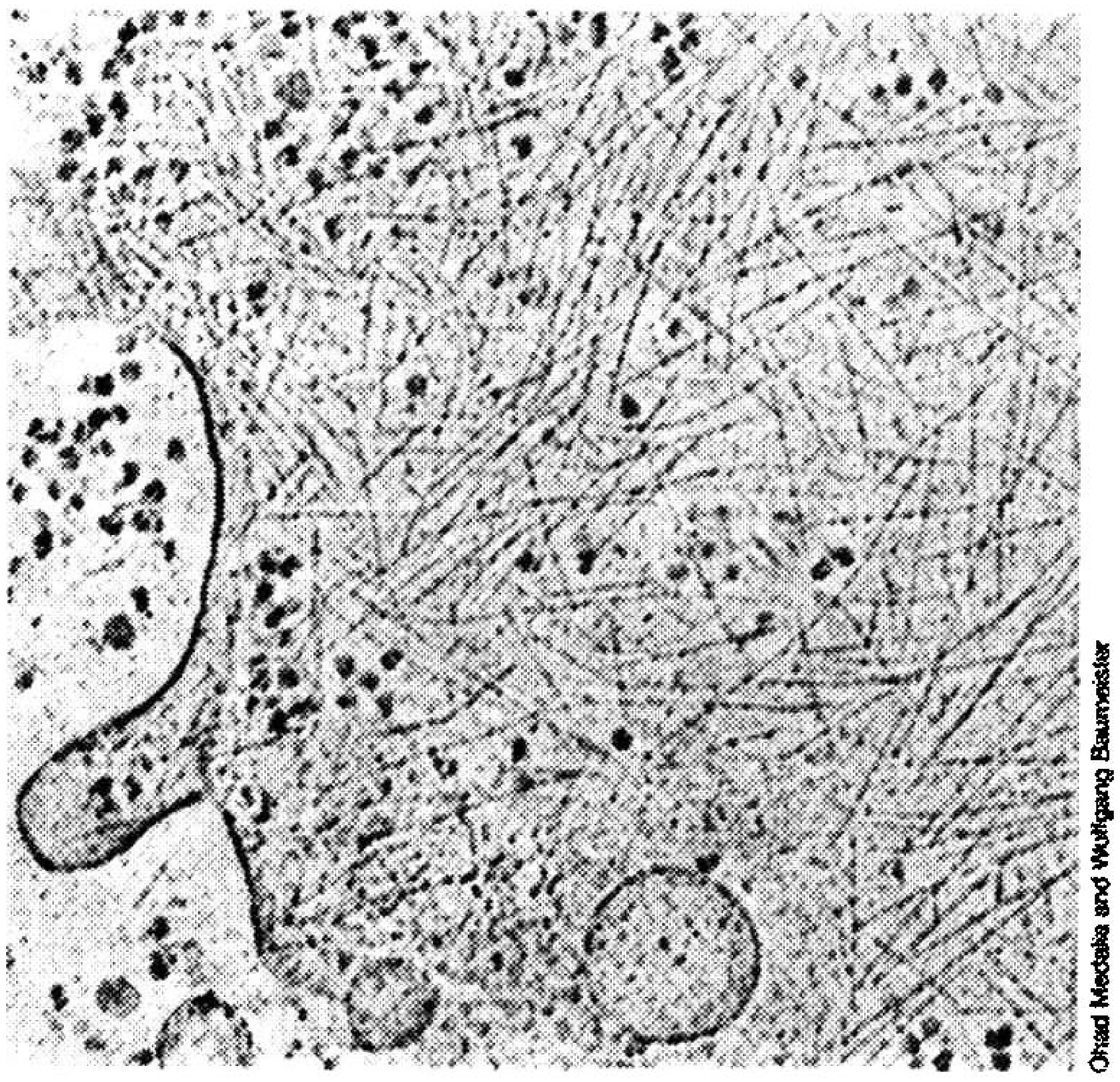


图14.9 微丝和真核细胞的构造。细菌型黏菌，盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）细胞的电子断层扫描图像（图14.28），显示了肌动蛋白微丝的网络，与微管一起构成细胞骨架。微丝的直径约8nm，电子断层扫描术是用透射电镜拍摄细胞的一系列三维图像，重建细胞形态的方法。

的运动（如具鞭毛的真核细胞的鞭毛运动，图 14.1 和图 14.10)。

在前面的章节里我们看到，原核细胞存在着分别与肌动蛋白和微管蛋白结构和功能相对应的同系物 MreB 和 FtsZ 蛋白（见 6.1 节)。这说明尽管原核生物明显比真核生物小得多，但它们仍需要一些最低水平的内部支架。在原核生物中存在 MreB 和 FtsZ 蛋白也表明真核生物的细胞骨架有着深厚的进化根基。

鞭毛和纤毛

鞭毛和纤毛存在于多种真核微生物中，是运动器官，使细胞通过游泳方式运动。纤毛实质上是短鞭毛，通常十分迅速地同步拍击以推动细胞穿过培养基。鞭毛是单个或成群存在的长附属物，以类似鞭打的方式（图 14.10a）推动细胞运动，鞭毛运动明显比纤毛慢。

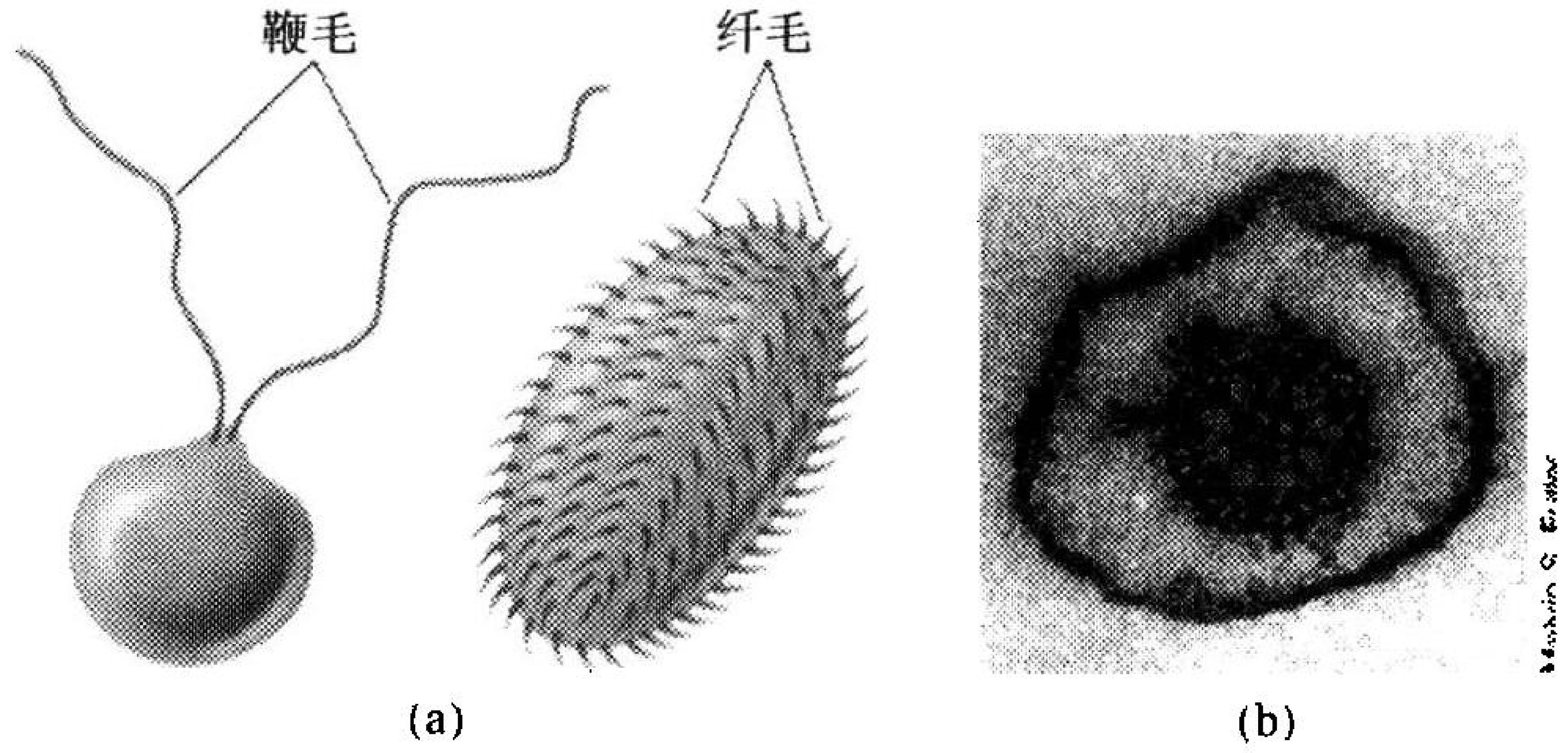


图 14.10 真核细胞运动器官鞭毛和纤毛。 (a) 鞭毛可以单根或多生的丝状物存在。纤毛的结构与鞭毛相似，但比鞭毛短的多。真核生物鞭毛以一种似鞭打的方式运动，而不像原核那样以旋转的方式推进细胞，（原核生物的运动）更像螺旋桨或摩托船（见 4.14 节和图 4.53～图 4.58)。(b) 真菌埃默森小芽枝霉（*Blastocladiella emersonii*）鞭毛的横截面，显示外鞘，外围的九对（二联体）微管，和中心的一对（单体）微管。

真核细胞的鞭毛结构与细菌十分不同（见 4.14 节)，并非旋转运动。纤毛和鞭毛的横切面非常相似，均由 9 对微管围绕成一圈，中心是一对中央微管，称为轴丝（axoneme)（图 14.10b)。微管由微管蛋白组成。另一种蛋白质称为动力蛋白（dynein)，它附着在微管蛋白上，起 ATP 酶的作用，水解 ATP 产生运动所需的能量。鞭毛和纤毛的运动很相似，都涉及两个轴丝微管沿细胞底部的相对协调滑动（图 14.10b)，朝向细胞或远离细胞。鞭毛或纤毛的这种鞭打样动作导致细胞推进。

原核生物的鞭毛与有真核生物明显不同，原核生物鞭毛的鞭毛丝是由螺旋状排列的一种鞭毛蛋白组成，其自身结构紧紧地锚定包埋在细胞壁和细胞膜内的旋转运动复合物中（图 4.56)。另外，细菌鞭毛起着类似船桨的作用，由质子动力的能量所驱动（见 4.14 节和 5.12 节)，而真核鞭毛则是通过微管的滑动以一种似鞭打的方式运动，由 ATP 提供的能量所驱动。虽然如此，在所有运动细胞中，运动性有生存的价值，具备运动能力使运动性微生物能探索新的栖息地并开发其资源。

概念检查

除了真核生物主要的细胞器，在细胞质中还存在一些其他具有明确功能的结构，包括核糖体和细胞脂类合成的场所——内质网，参与蛋白质修饰和分泌的高尔基体，在大分子的消化中起作用的溶酶体，和 H_2O_2 的产生器官——过氧化物酶体。还有构成细胞骨架的蛋白质管，被称为微丝和微管。鞭毛和纤毛是运动器官，它们具有广泛的微管状结构。

- ◆ 光面内质网和糙面内质网有何不同?
- ◆ 为什么发生在溶酶体中的活性最好与细胞质隔离开?
- ◆ 除了框架支撑作用，微管还有什么其他的功能?

Ⅱ 真核生物的遗传学和分子生物学概论

大部分原核细胞与真核生物相比在遗传学和分子生物学的一些方面缺乏相对应的结构和功能，包括①线性（与环状相对的）遗传因子的复制；②减数分裂和有丝分裂；③mRNA的加工。在此我们简要探讨这些问题。

14.6 线性 DNA 的复制

大部分原核生物染色体是环形，如大部分质粒、一些病毒，以及大多数细胞器的基因组（见 15.7 节）。与此相反，真核细胞具有线性（linear）DNA。不论是线性染色体还是环形染色体，几乎所有的 DNA 复制步骤都是同样的。然而线性遗传因子存在一个在复制上的关键问题，在环形中没有，这就是每个链的 5′端 DNA 的复制（replication of DNA at the extreme 5′-end of each strand）。

为了理解问题的本质，还要回头看图 7.13。可以设想在这个图中，DNA 的左边就是线性染色体的一端，即使 RNA 引物很短，有一个特异的酶去除它，DNA 聚合酶又都需要引物，所以没有聚合酶能用 DNA 取代它，就这样的话，DNA 分子每复制一次就会变短一点。因此线性 DNA 的复制需要特别地关注，至少已有两种方法解决这个问题。

利用蛋白质引物复制线性 DNA

含有线性 DNA 基因组的病毒（包括大部分感染真核生物的病毒）和许多线性质粒，它们不是用 RNA 引物而是用一个蛋白质（protein）引物来解决线性 DNA 复制的问题。虽然所有的 DNA 聚合酶必须把每一个核苷酸加到一个自由的羟基上，但也有些 DNA 聚合酶能够把第一个碱基加到一个特殊蛋白质的羟基上，这种蛋白质结合在这些线性染色体的一端（图 14.11）。这些蛋白质是由质粒或病毒编码的，它们的功能是用来识别染色体末端。这些蛋白质引物不被除掉，所以这些质粒和病毒在它们 DNA 的 5′端有一个永久结合的蛋白质。蛋白质引物也可能是细菌的一些线性染色体（见 15.4 节）复制的一种方式。

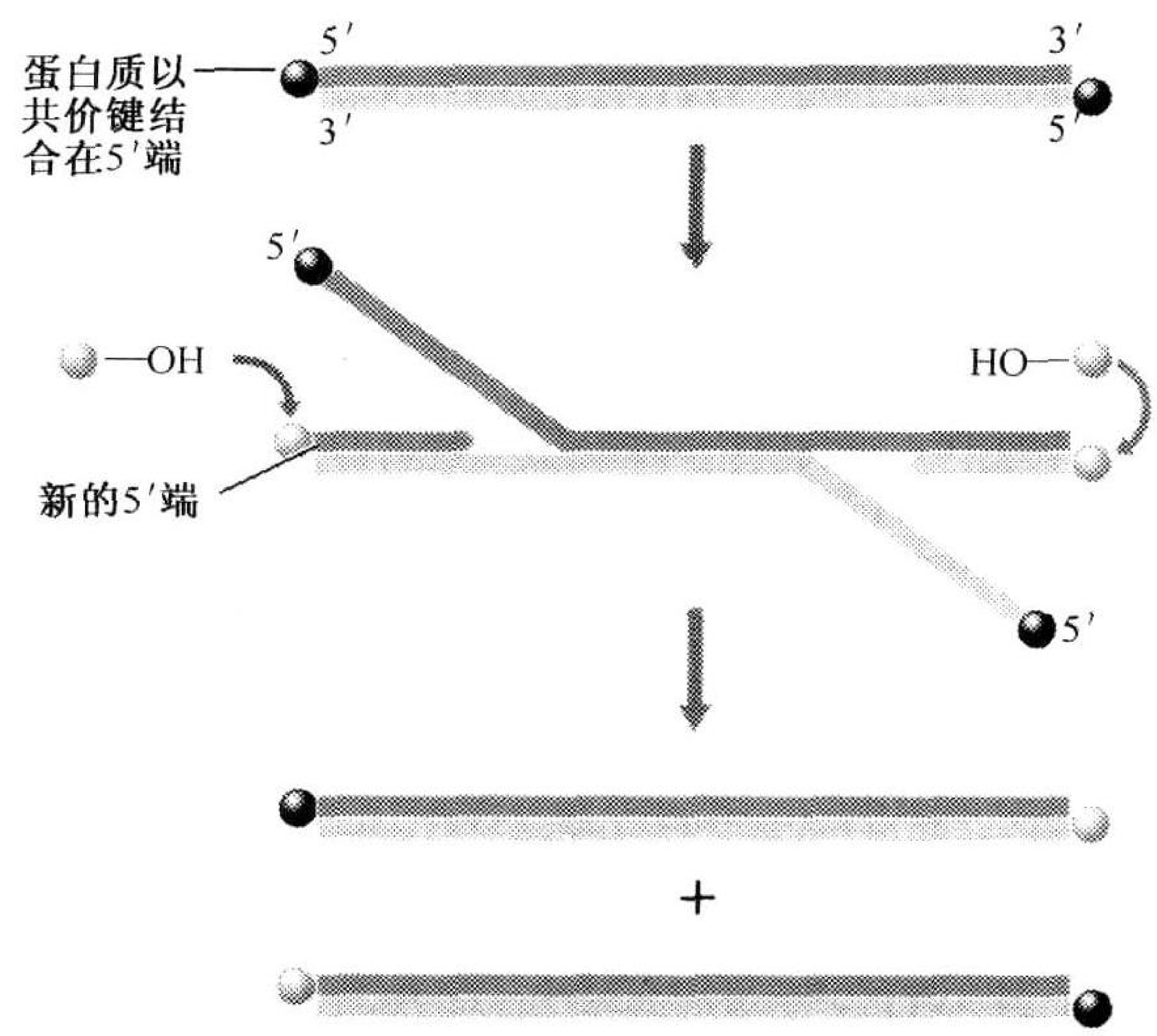


图 14.11 利用蛋白质引物复制线性 DNA。通过以共价键结合在 5′端的蛋白质引发 DNA 新链的合成。图中标明蛋白质上的自由羟基（—OH）。DNA 聚合酶Ⅲ可以将一个核苷酸加到这个羟基上。

端粒和端粒酶

一个特殊的方法被用于复制真核染色体的末端。染色体的末端称为端粒（telomere），它含有重复的 DNA：一个短序列（常常是 6 个碱基）随机重复 20 到几百次（图 14.12a）。不同真核生物的端粒序列密切相关，在一条 DNA 链上总是有几个鸟嘌呤。就复制而言，这个鸟嘌呤丰富的序列存在于 DNA 双链体的前导（leading）链上，可以通过端粒酶（telomerase）与互补 RNA 链的 3′端碱基配对（图 14.12a）。

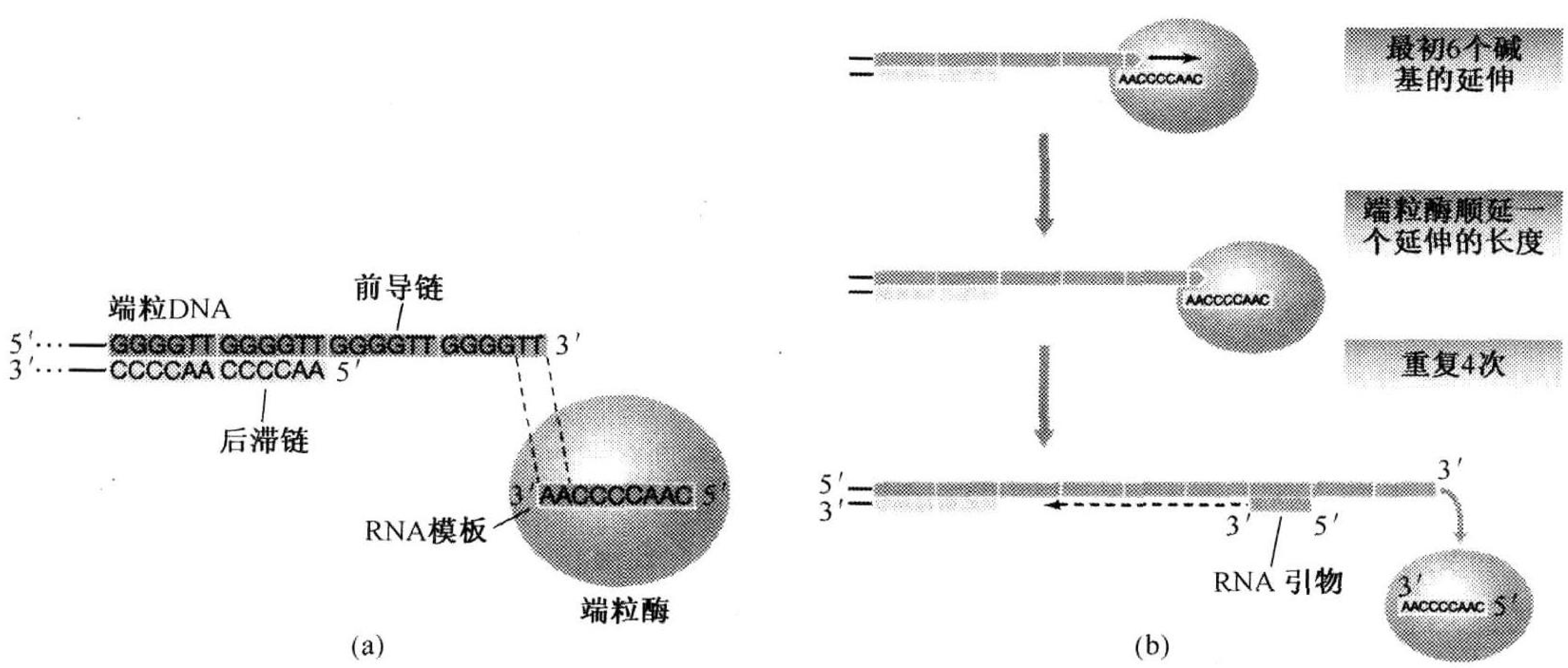


图 14.12 真核生物染色体的一端端粒酶作用模型。（a）DNA 末端端粒的序列图解，在端粒中有 4 个富含鸟嘌呤序列的重复，端粒酶含有一个短的 RNA 模板。（b）富含鸟嘌呤链的伸长步骤是由端粒酶催化的。端粒酶完成任务之后，通过引发酶合成 RNA 引物引发后滞链的合成。以后的步骤（未给出）通过 DNA 聚合酶和连接酶完成后滞链的合成。

一旦结合到端粒 DNA 富含鸟嘌呤区域突出的 3′端，端粒酶就开始有活性。端粒酶不需要模板来起始 DNA 合成，因为它有一个小的 RNA 模板作为辅助因子。端粒酶本质上是一种反转录酶（见 9.13 节），以 RNA 为模板合成 DNA。这些酶能够重复地工作合成一个较长的前导链（leading strand）。这条链一旦延伸到足够长，另一条链——后滞链（lagging strand）就能以正常的方式引发合成 RNA 引物，复制 DNA（图 14.12b）。端粒并不需要精确的重复数量，只要长度正好能够保证 DNA 复制中没有遗传信息的丢失即可。

概念检查

线性遗传因子末端对于复制机制来说存在一个问题，这个问题在环形遗传因子的复制机制里并不存在。一些原核生物和病毒的线性遗传因子解决这个问题是用蛋白质引物，真核生物解决此问题是利用一个称为端粒酶的特异酶来延伸 DNA 的一条链。

◆ 蛋白质引物如何引发 DNA 复制？

◆ 什么是端粒酶？它有什么功能？

14.7 真核生物的遗传学概述

在此我们简要思考真核生物遗传学的一些原理。真核细胞通过有丝分裂分开，然后经历有性繁殖，在此过程中，通过减数分裂产生雄配子和雌配子，然后两者融合形成合子。这与原核生物中的单向交配过程是根本不同的（见第 10 章），因此我们用面包酵母（baker's yeast）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）作为真核生物模型，来讨论这些问题。

减数分裂和有丝分裂

从遗传学的观点看，真核生物的细胞以两种形式存在：单倍体（haploid）或二倍体（diploid）。二倍体细胞内每个染色体有两个拷贝，而单倍体细胞只有一个拷贝。酿酒酵母的细胞能够以单倍体（营养）阶段（16 条染色体）无限制地存在。但是偶尔，两个单倍体酵母可以融合（交配）产生一个双倍体细胞（32 条染色体）（图 14.14）。这一过程不应该与多细胞植物和动物细胞中的情形相混淆，这些生物体自身以双倍体相存在，仅在配子时是单倍体相。

有丝分裂（mitosis）是指伴随着 DNA 复制，细胞中的染色体浓缩，分裂，被均分为两份，每个子细胞各分到一份染色体的过程（图 14.13）。酿酒酵母单倍体细胞在每个细胞分裂之前进行减数分裂，从而保持每个细胞有 16 条染色体。减数分裂（meiosis）是指从双倍体阶段转变成单倍体阶段的过程。减数分裂涉及二次分裂：在第一次分裂中，同源染色体分离，被分配到各自分开的细胞中，遗传状态由双倍体变为单倍体；第二次分裂实质上与有丝分裂相同，2 个单倍体细胞分裂总共生成 4 个单倍体配子（子囊孢子，图 14.14）。

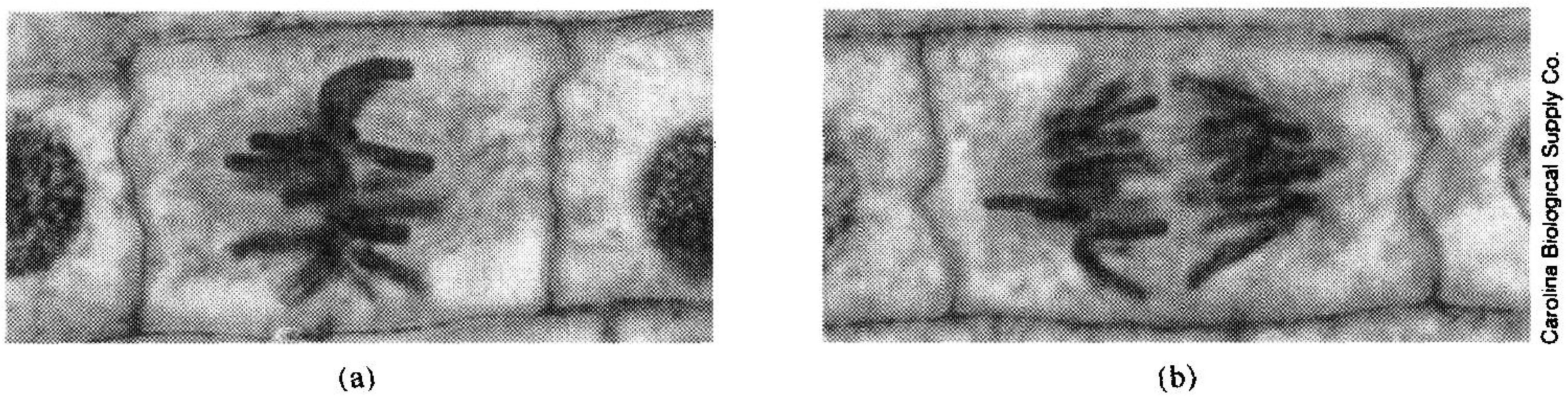


图 14.13　光学显微镜下的有丝分裂。洋葱根尖细胞，经染色后呈现核酸和染色体。(a) 中期，成对的染色体在细胞中央。(b) 后期，染色体正在分开。

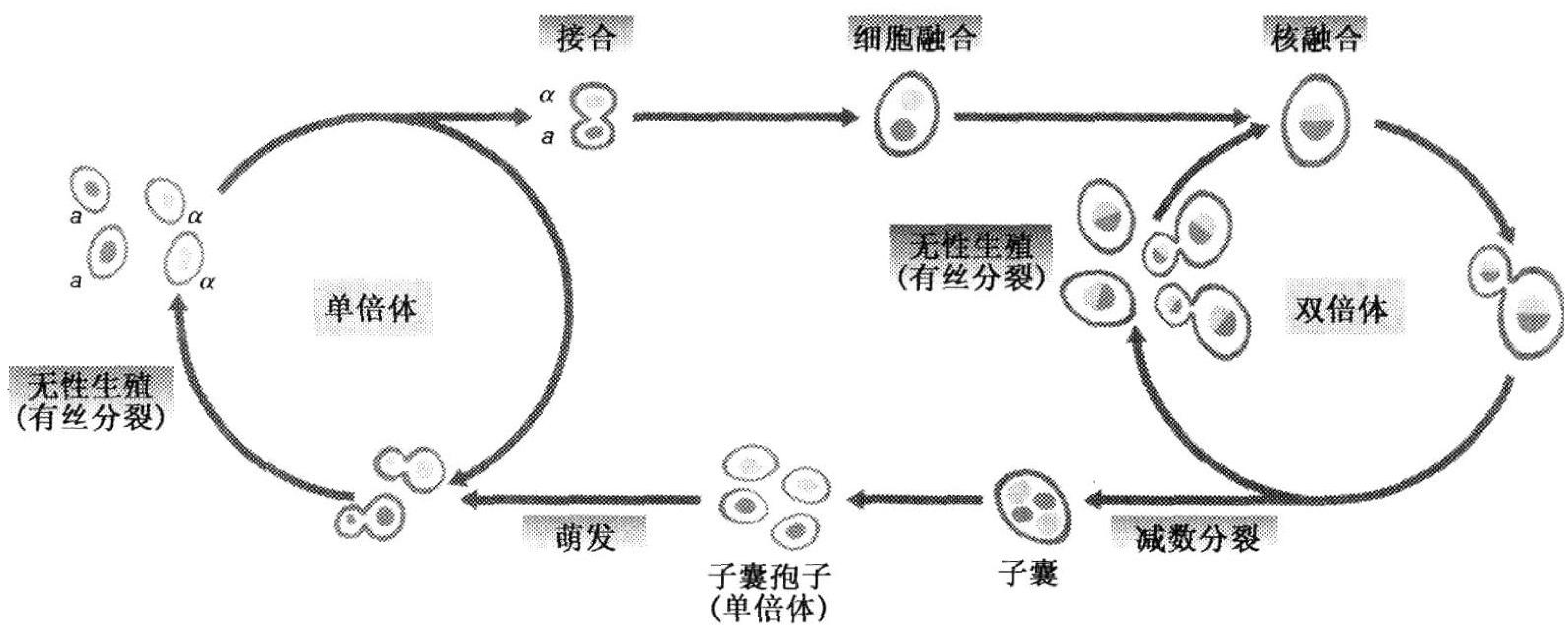


图 14.14　一种典型的酵母菌——酿酒酵母的生活史。酿酒酵母的每一单倍体细胞中含有 16 条染色体。

酵母中的交配过程：接合类型

酵母有两种不同的单倍体细胞类型，称为接合型（mating type），它们类似于高等生物中的雄配子和雌配子。不同类型的单倍体可彼此接合形成二倍体细胞。一个二倍体细胞能形成两种不同接合型的 4 个配子。形成配子的二倍体细胞称为子囊（ascus），子囊内的细胞称为子囊孢子（ascospore）（图 14.14）。

酿酒酵母的两种接合型分别为 α 型和 a 型。a 型的细胞仅与 α 型细胞接合，是何种接合型则由自身的基因决定。酿酒酵母的一些单倍体菌株保持 a 型或 α 型，而其他菌株可相互转换它们的接合型。这种转换是由一段插入的基因引起的，图 14.15 解释了这个转换过程。

酿酒酵母染色体中有一个位点，称 MAT（表示接合型）位点，a 和 α 基因都可插入该位点。MAT 启动子控制着在该位点上的任何一个接合型基因的转录。所以，若 a 基因位于该位点，细胞表现为 a 型，相反如果该位点为 α 基因，则细胞的接合型为 α 型。许多情况下酵母基因组中同时含有 a 和 α 基因的拷贝，但它们并不表达。这些沉默的拷贝（silent copy）可作为转换时插入基因的来源。转换时（图 14.15），适当的基因 a 或 α 基因，由沉默位点拷贝并插入到 MAT 位点，替换（replacing）该位点上原有的基因。因此原来的接合型基因从这里被切除并丢弃掉，新的基因插入。这一机制称为盒

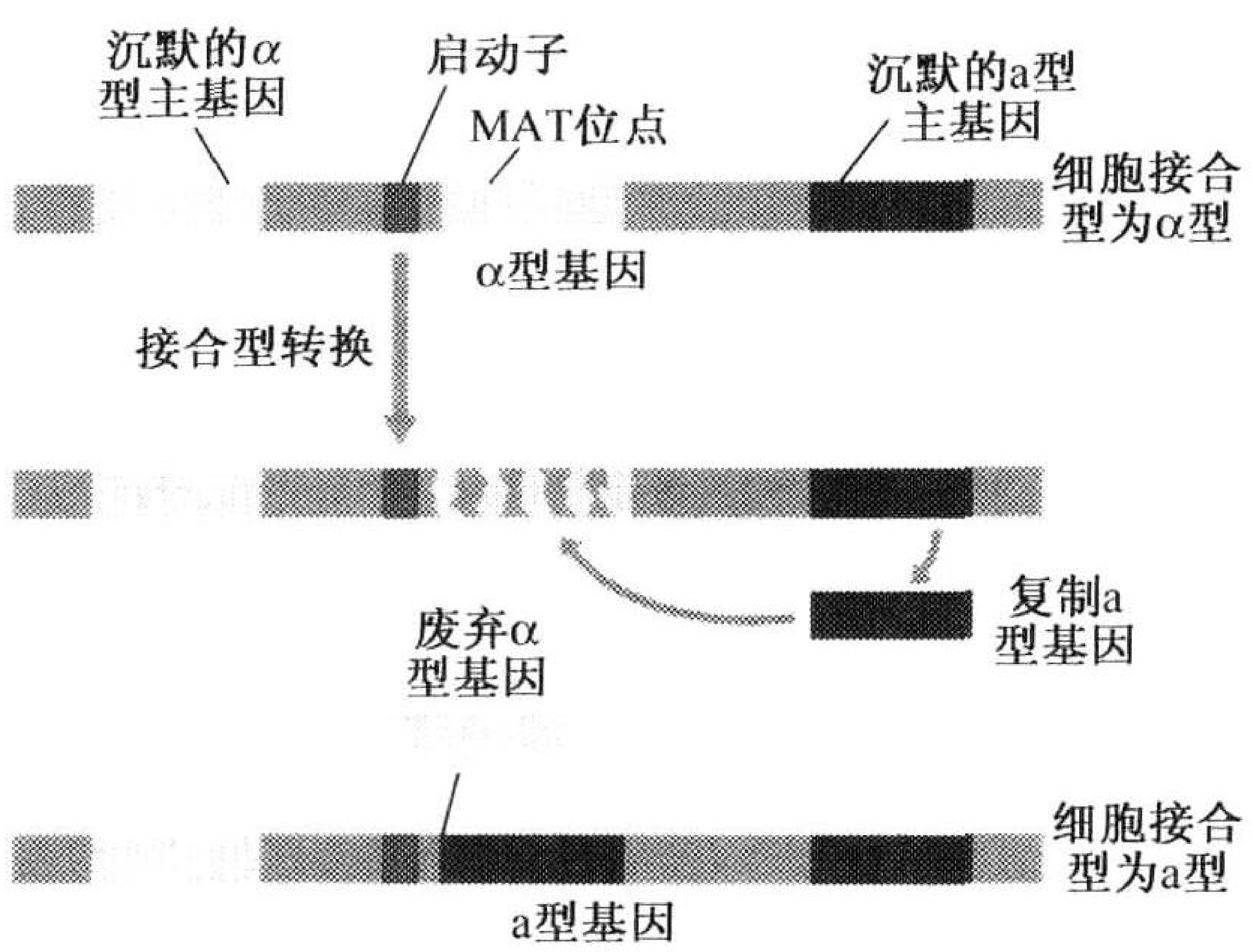


图 14.15　酵母菌接合型 α 和 a 相互转换的盒式机制。插入到活跃部位的基因决定细胞的接合型。图示的过程是可逆的。因此 a 型也可转换为 α 型。

式机制（cassette mechanism），因为这一机制中 a 和 α 基因类似盒式录音带，哪个基因插入到 MAT 位点，哪个基因将被转录。

酿酒酵母的 α 和 a 基因是调节（regulatory）基因。除了其他的功能，它们还调控肽类激素 α 因子（α factor）或 a 因子（a factor），这些因子是由处于结合阶段的酵母细胞所分泌的。这些激素结合到另一种接合型细胞上，引起细胞表面的变化并进一步发生融合（图 14.16）。一旦两种接合型细胞连在一起，就会发生细胞融合以及细胞核融合，导致一个二倍体合子的形成（图 14.16），合子经减数分裂再生单倍体营养形式，由此构成完整的生活史（图 14.14）。

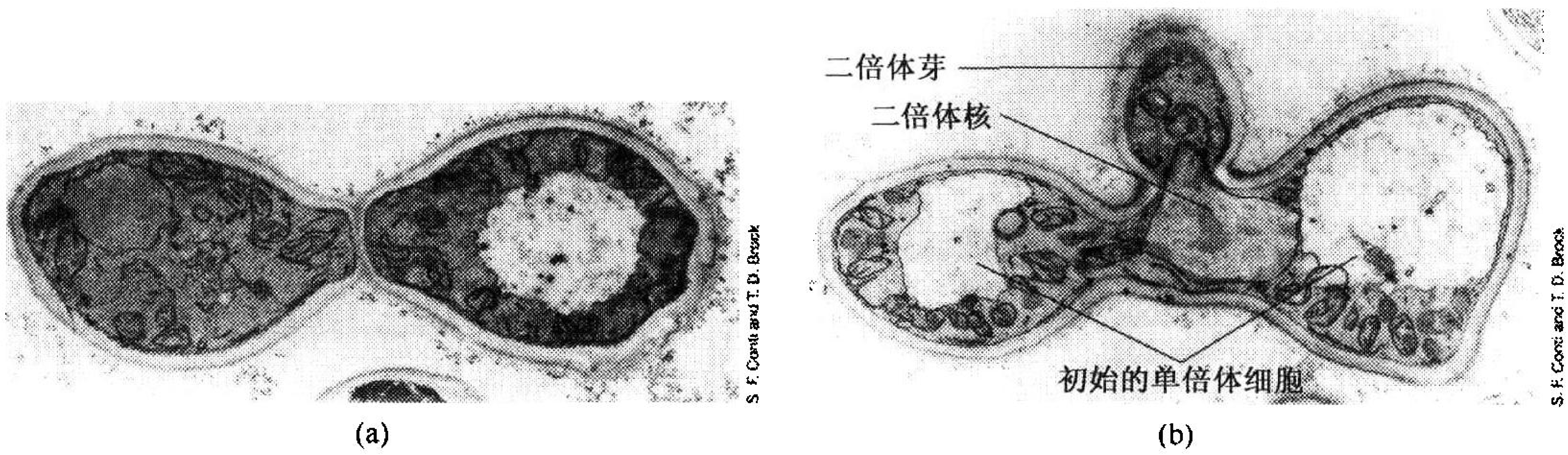


图 14.16　温齐氏汉逊酵母（*Hansenula wingei*）接合过程的电镜照片。（a）两个细胞在接触点融合，相互伸出突起。（b）接合后期。两细胞的核融合并形成二倍体的芽与接合管成直角，最终与母体分离成为二倍体细胞的前体。温齐汉逊酵母单个细胞的直径约 10μm。

概念检查

真核微生物在有性繁殖时能接合并交换 DNA。有丝分裂保证了在无性的细胞分裂过程中染色体正确分离。减数分裂产生的单倍体细胞能融合形成一个双倍体的合子。在酵母中有两种交配型，酵母细胞可以在这两种类型间相互转化。

◆ 人细胞中的双倍体染色体数目是 46，在人的精子细胞中的染色体数目是多少？
◆ 解释酵母的一个单个的单倍体细胞是如何最终产生一个双倍体细胞的？

14.8 RNA 加工和核酶

在第 7 章中我们已经讲过 RNA 转录的几种类型：mRNA、tRNA 和 rRNA（见 7.10 节）。在真核生物中，mRNA 经过切割（cleave）去掉内含子（intron）——间断的非编码 RNA，这一过程称为 RNA 加工（RNA processing），而原核生物中极少这样。mRNA 留下外显子（exon）——编码蛋白质的 RNA，连接形成成熟的（有功能的）mRNA（见 7.1 节）。去除内含子，将外显子连接起来的过程称为剪接（splicing）。

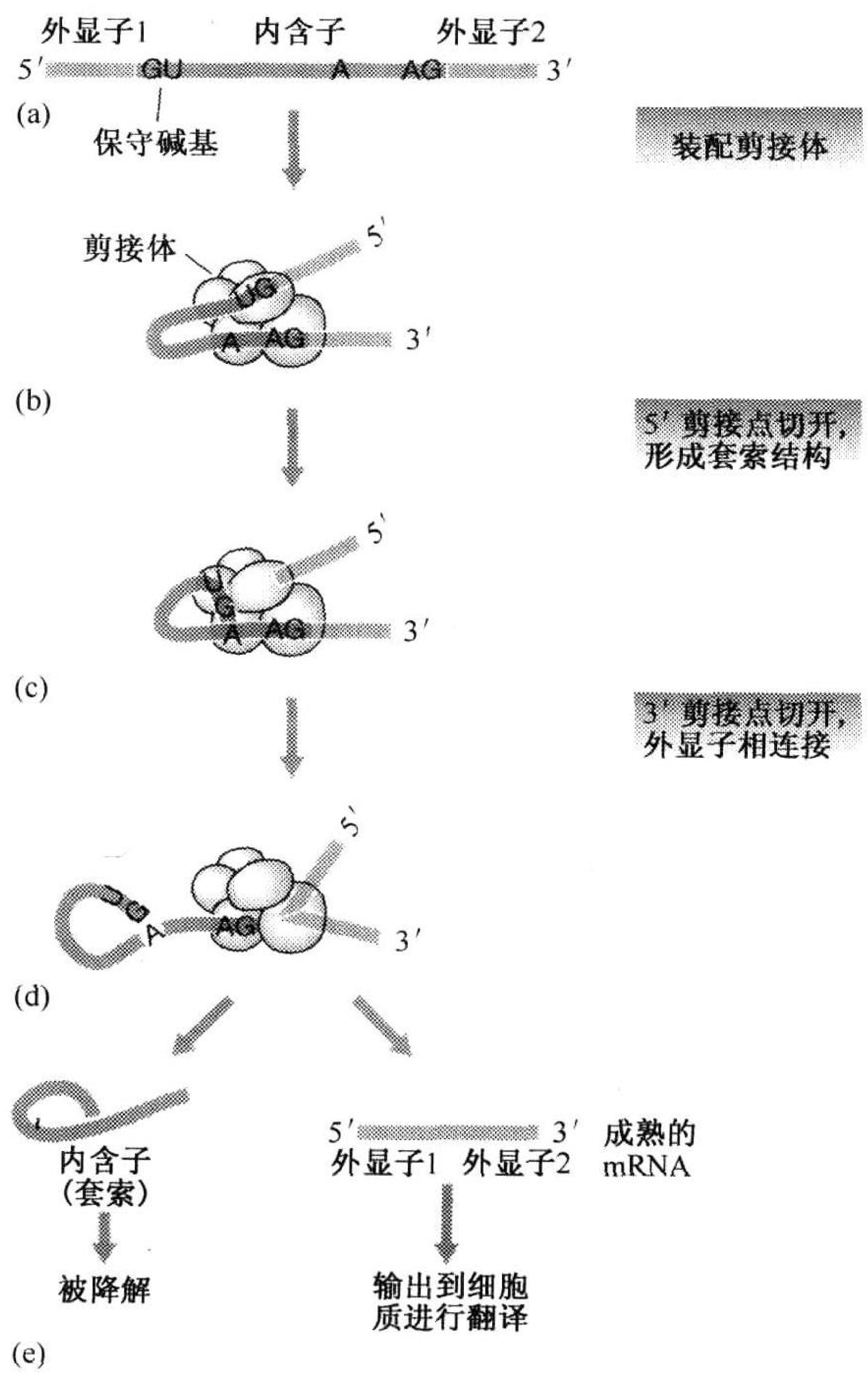


图 14.17 剪接体的行为。从真核生物编码蛋白质基因的转录物中去除内含子。(a) 具有一个内含子的前体 mRNA。在 5′剪接点保守 GU 序列，在 3′剪接点保守 AG 序列。内含子有一个 A 作为分支点。(b) 几个小的核酸蛋白颗粒（以褐色显示）结合在 RNA 上形成剪接体。每一个颗粒都含有独特的小 RNA 分子参与剪接机制。(c) 5′剪接点切开的同时形成分支点。(d) 3′剪接点切开，两个外显子连接起来。总之，打开两个磷酸二酯键，而同时形成另外两个磷酸二酯键。(e) 终产物是连接在一起的外显子，即 mRNA，和被释放的内含子。

剪接体、RNA 加帽和 poly A 尾巴

剪接涉及一个复合体，它含有几种核酸蛋白质（含有 RNA 和蛋白质的酶）称为剪接体（spliceosome）。剪接体是一个大分子复合物（与核糖体大小相似）含有其他非剪接体蛋白因子，大约 100 种蛋白质参与它的活性。剪接体的功能是去除内含子，连接邻近的外显子以形成成熟的 mRNA（图 14.17）。

RNA 剪接发生在当 mRNA 仍在细胞核中的时候。在剪接界存在一些保守的碱基（splicing junction），剪接后内含子作为一个套索结构（lariat structure）被除去（图 14.17）。这些去除的内含子被细胞降解，释放自由的核酸。在许多 mRNA 中，一个基因中的内含子有很多，所以它们全部被识别、由剪接体去除掉以形成最终的成熟 mRNA 是非常重要的。

在真核生物 mRNA 的加工过程中，有两个独特的步骤。这两个步骤都发生在细胞核中，是在剪接、转移成熟的 mRNA 到细胞质翻译之前进行的。第一步称为加帽（capping），事实上在完成转录之前就开始进行了。加帽是在 mRNA 的 5′磷酸末端加上一个甲基化的鸟嘌呤核苷酸（methylated guanine nucleotide）。加帽的时候，真核生物 mRNA 5′端的其他核苷酸偶尔也会被修饰。接下来的剪接过程是在前 mRNA 的 3′端进行修饰，加上大约 200 个腺苷酸残基，作为多聚 A 尾巴（polyA tail）。无论是帽子还是多聚 A 尾巴都不被翻译。

鸟嘌呤帽子通过特异的帽结合蛋白来启动 mRNA 和核糖体间起始复合物（initiation complex）的形成，从而启动翻译（见 7.16 节）。多聚 A 尾巴的功能不是很清楚。它可能影响真核生物 mRNA 的降解速率，可能保护它不被 RNA 酶迅速地降解。另外，多聚 A 尾巴还有可能是“可译性”的一个分子信号，暗示翻译机制，RNA 是 mRNA 而

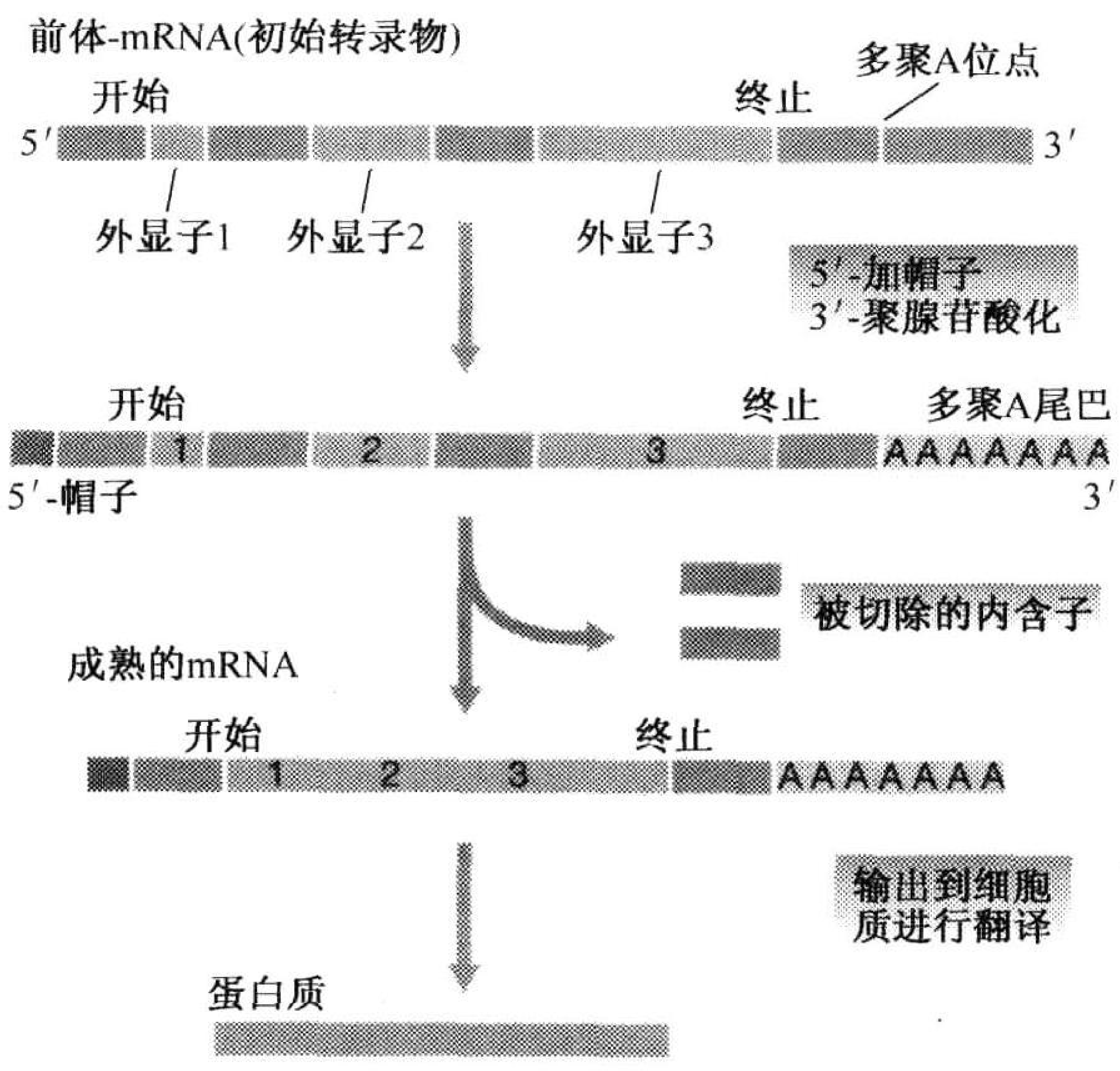


图 14.18　真核生物中前体 mRNA 变成成熟 mRNA 的加工过程。加工步骤包括在 5′端加帽，除去内含子，剪下转录物的 3′端，再加上多聚 A 尾巴。所有这些步骤都是在细胞核中进行。也指出用于翻译的开始和终止密码区。

不是其他类型的 RNA，可以准备进行翻译了。

图 14.18 总结了真核生物 mRNA 形成的 3 个步骤。在真核生物中合成成熟的有功能的 mRNA 是一个复杂的动态过程，涉及一些原核生物转录过程所没有的步骤。在原核生物中大部分基因转录后直接形成有功能的 mRNA（见 7.13 节）。

核酶

某些类型的 RNA 在细胞中还能够起到酶的作用，这些具有催化作用的 RNA 称为核酶（ribozyme），它参与许多重要的细胞内反应过程。尽管在原核生物也发现存在一些核酶，但它们在真核生物中更普遍存在。核酶与蛋白酶一样存在“活性位点”与底物结合，催化产物形成（见 5.5 节）。

大部分真核生物的核酶是自我剪接内含子（self-splicing intron），它们能够从 RNA 分子中去除它们自己，然后把邻近的外显子连接在一起。原生动物四膜虫（*Tetrahymena*）的核酶已被研究得很清楚。它是 413 个核苷酸的内含子，位于鸟嘌呤核苷的前面，从一个较长的前体 rRNA 剪接自己，并连接两个邻近的外显子形成最终的 rRNA（图 14.19）。因此四膜虫的核酶是序列特异性的内切核酸酶（sequence-specific endori-

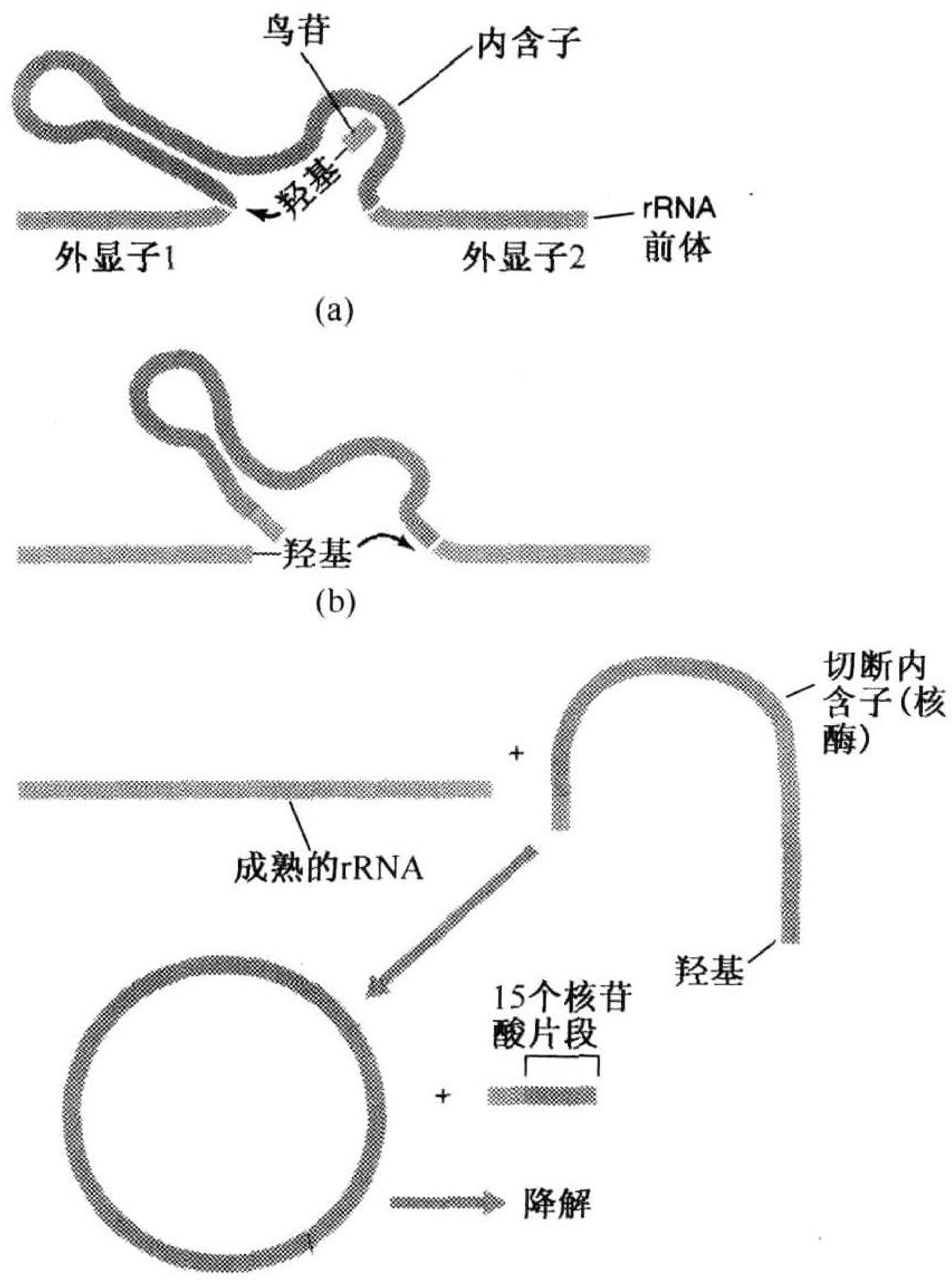


图 14.19 原生动物四膜虫的核酶内含子的自我剪接。这个分子中有重要的二级加工，在拼接反应中起重要作用。(a) 核糖体 RNA 前体含有 413 个核苷酸内含子。(b) 随着鸟苷的加入，内含子自我剪接同时连接两个外显子。(c) 内含子分离开，随后环化，丢失 15 个核苷酸的片段。

bonulease)，执行类似剪接体的功能。内含子一旦从前体 RNA 中被切除，去除一小段寡聚核苷酸后的内含子会进一步环化（图 14.19)。

尽管像蛋白酶那样催化特定的反应，自我剪接的核酶在一个关键方面与蛋白酶不同，即它们只能发挥一次作用。例如，四膜虫核酶的环形片段最终被细胞降解（图 14.19)。这种能进行自我剪接的核酶［被称为Ⅰ型内含子（group Ⅰ intron)，在反应中需要一个外源的鸟嘌呤核苷］在真核生物的其他各种基因中广泛存在，也存在于线粒体和叶绿体的某些基因中。

为什么核酶会在蛋白酶掌控的环境里存在呢？这可能是因为核酶是一个简单生命形式退化器官的残存。“RNA 生命”可能在蛋白质时代以前作为细胞的主要催化剂。实际上，在细胞状结构进化之前，可能早就存在一个 RNA 世界。我们在第 11 章讨论了这个观念（见 11.2 节)。尽管几乎在生物催化的各个方面，蛋白质替代了 RNA 酶，仍保留有少数反应是 RNA 催化的。之所以这样，要么是来自 RNA 世界的最后的“坚守者”，要么有些反应是蛋白酶不能催化或者催化能力极弱。

概念检查

真核生物的前体 mRNA 加工过程是独特的，要进行 3 步不同的加工步骤：剪接、加帽和加尾。在一些其他的转录物中，存在着内含子的自我剪接，RNA 自我催化反应。具有催化活性的 RNA 分子称为核酶，在细胞中起重要作用。

◆ 什么是剪接？在哪里发生剪接？进行剪接需要什么？

◆ 什么是核酶？所有的第一类内含子的酶活性需要什么底物？

Ⅲ 真核微生物的多样性

现在我们来讨论微小的真核生物（*Eukarya*）的多样性。它们包括原生动物、黏菌、真菌和藻类。我们从思考这类生物的系统发育开始，在此将认识到微小的真核生物在其生物学的许多方面是不同的，有些生物体的进化程度相当高，而有的种进化程度要小得多，仍保持着古代真核生物的特性。

14.9 真核生物的系统发育

从生命普通系统发育树（图 11.13）中，我们可以看出真核生物形成了它们自己的系统发育区域，与古生菌（*Archaea*）更为接近，而距细菌要远一些。真核生物的系统发育是通过比较 18S rRNA 的序列推导出来的，18S rRNA 来自细胞质核糖体的小亚基(small subunit，SSU)（见 11.5 节)。

大部分微生物学家认为基于序列（尤其是 rRNA 的小亚基）对比的系统发育树是可获得的最好的分子树，通常产生一个有效的微生物系统发育图。但由此方法确定的原核生物（细菌和古生菌）领域的系统发育更能得到一致的认可。通过比对某些真核生物的基因和蛋白质序列，已形成了另一个真核生物的进化树，其拓扑结构（topology）与

基于 18S rRNA 的进化树差异极大。就这一点而言，究竟是哪一种进化树最好地描述了真核生物的系统发育，还没有达成共识。因此，我们在此呈现两种系统发育树，画出真核生物系统发育的对比图（图 14.20）。我们从 SSU 树开始，它在早期的和进一步衍生的真核生物内有明显的区别。接下来，我们讨论另一种树，它认为主要的系统发育的辐射在真核生物进化时发生。SSU 树和另一种树都认可生命的 3 大领域，主要在真核生物谱系的细节上存有分歧。

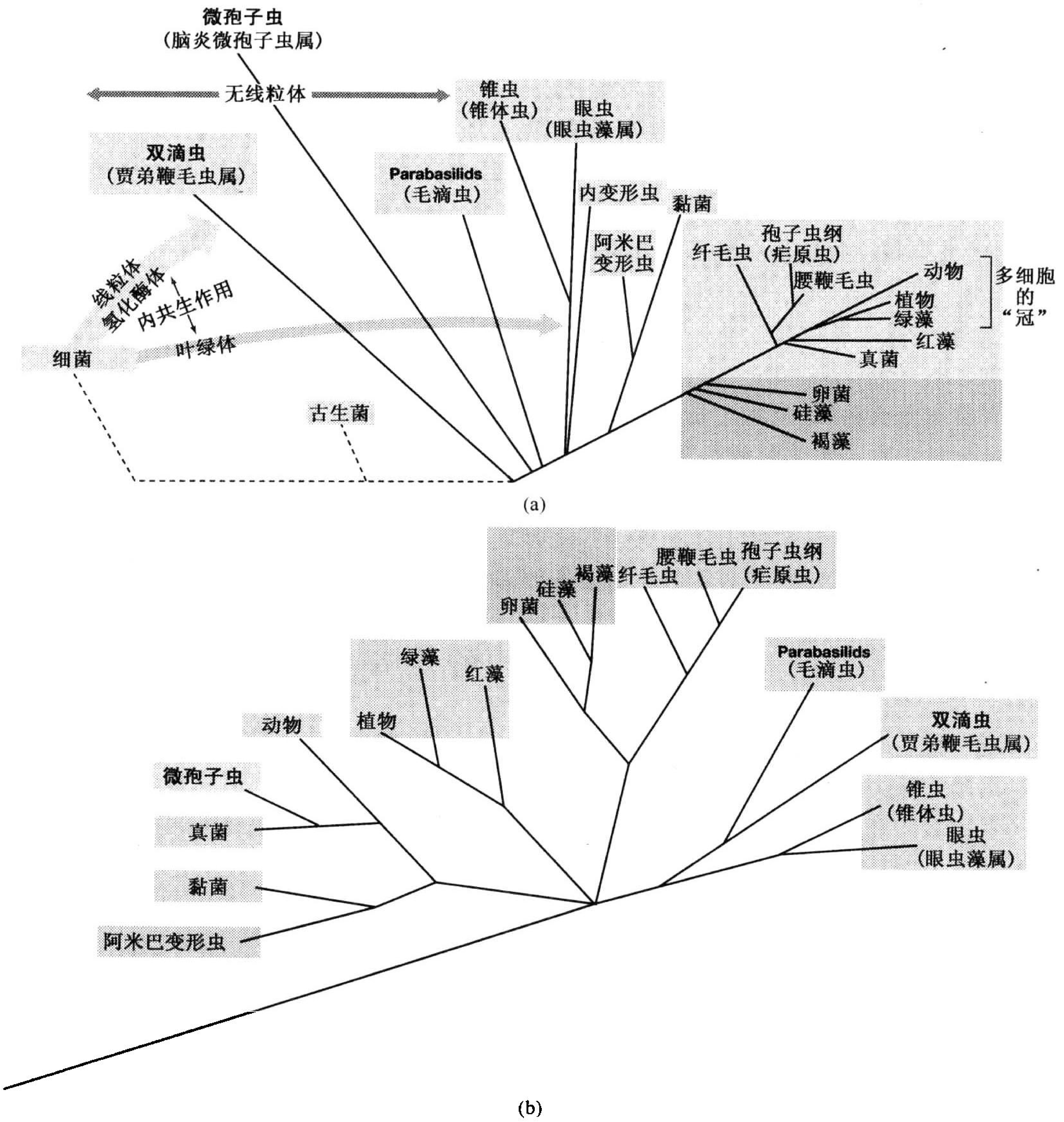


图 14.20 真核生物系统发育树。（a）根据 18S rRNA 序列分析绘制的进化树。注意内共生体（线粒体和叶绿体）是如何被显示起源于细菌区域的。（b）根据真核生物其他基因和蛋白序列分析绘制的进化树。在（a）中系统发育早期的谱系在（a）和（b）中都突出标示了。

真核生物的 rRNA 谱系树

在分子系统发育时代之前，真核生物被分为 4 个界（kingdom）：植物（plant）、动物（animal）、真菌（fungi）和各种被称为原生生物（protist）的微小的真核生物。这四界和原生动物（prokaryote）——被简单编在一个系统发育界，一起形成被称为活生物体的五界（five kingdoms of living organisms）。然而，SSU rRNA 序列分析已令人信服地表明，五界体系极大地夸大了多细胞的植物和动物在进化中的重要性，完全忽视了原生动物广泛的种类多样性。SSU 树矫正了这种情况，在此过程中，揭示了一个十分迷人的真核生物的系统发育。

图 14.20a 显示真核生物的 SSU 系统发育的细节。将真核生物进化树与细菌和古生菌谱系一起看，提示我们，主要的细胞器——线粒体和叶绿体起源于细菌体内。而且相比细菌而言，在许多方面古生菌和真核生物更相近似，大量的证据支持这样的结论。我们也可以看到一些微小的真核生物在 SSU 树中位于系统发育早期（图 14.20a）。相反的是，植物和动物这些高度进化的生物体，在真核生物谱系的顶部形成了一个"冠"。藻类在真核生物进化树（尤其是在相当近期的谱系中）呈散在分布，而真菌 [除了卵菌纲（Oomycetes）] 形成一个十分紧凑的、近期的系统发育单位（图 14.20a）。

早期的真核生物

真核生物的 rRNA 树显示了一个生物体的"阶梯"，即从最不进化的真核微生物到"顶部冠状的物种"（图 14.20a）。最令人感兴趣的是系统发育早期的真核生物，即那些由古代祖先经历最缓慢进化而形成的现代生物体。rRNA 树清楚地鉴定了双滴虫（diplomonad），如贾第鞭毛虫属（*Giardia*）；微孢子虫（microsporidia），如脑炎微孢子虫属（*Encephalitozoon*）；以及 Parabasilids，如毛滴虫等早期的真核生物。这些生物体还有哪些特性，支持这样的结论呢？

贾第鞭毛虫、毛滴虫和脑炎微孢子虫属与其他真核生物的主要不同之处在于：它们都是无线粒体的真核生物。所有的这些生物体含有一个膜包围的核，但没有线粒体。有些，如毛滴虫，具有氢化酶体（见 14.2 节和图 14.4），而其他没有。这些生物体是没有经历内共生的古代真核生物的遗种（relics）吗？尽管可以从 SSU 树的拓扑结构得出这一结论，但遗传学和其他的研究不支持它。

通过灵敏的核酸鉴定方法和基因组序列数据表明：无线粒体的真核生物其细胞核内含有起源于细菌的基因。它们与线粒体的基因类似，现在仍存在于厌氧真核生物的细胞核内（见 14.4 节和 15.7 节）。这揭示出无线粒体的真核生物曾经拥有内共生体，但由于某种原因，丢弃了它们，仅以细菌特异性基因的形式在生物体细胞核内留下它们以前存在的痕迹。

无线粒体的真核生物一旦拥有线粒体，就获得可显现的遗传特性也提供了进一步的证据。例如，在贾第鞭毛虫体内，科学家发现这种生物体产生线粒体样的蛋白质，这些蛋白质在细胞中聚在一起。使用高分辨率的电镜可以看到这些蛋白质被小的双层膜囊包围着，这些线粒体残迹被称为纺锤剩体（mitosome）。在其他一些无线粒体的真核生物，如内变形虫（*Entamoeba*）中也陆续发现了纺锤剩体的存在。内变形虫是一种无线

粒体的真核生物，SSU rRNA 序列分析认为它比贾第鞭毛虫更进化（图 14.20a）。据推测，纺锤剩体是高度退化的线粒体，只含有少数的蛋白质用于产生能量。

从氢化酶体、线粒体的存在，到现在发现纺锤剩体，好像现存的真核生物没有不具有线粒体的。一个从未与呼吸的或发酵的细胞器建立起内共生的关系的真核微生物，要么都灭绝了，要么科学家们还没有发现它们。如果这种生物存在，它们的细胞核内应该没有细胞器基因和所有细菌来源的基因。而且，根据 18S rRNA 序列分析，在真核生物进化树中，它们的分枝甚至应该比贾第鞭毛虫更早（图 14.20a）。

如果存在从未拥有过内共生体的细胞，那么寻找它们对真核生物多样性感兴趣的科学家来说，将是一个令人兴奋的挑战。rRNA 的群落采样分析法被用来研究这个问题，即分析来自各种栖息地的 rRNA，尤其是无氧的，非常热的栖息地（条件与地球早期的环境相近似，见 11.1 节）。如果这种生物现今存活，通过 18S rRNA 特异的 PCR 引物可以检测到它们。检测在 SSU 树中分枝早于贾第鞭毛虫的物种的 rRNA，并尝试得到其生物体的培养物。可以预测，这样的生物体将会展示许多不同寻常的特征。

微孢子虫的问题

微孢子虫是进化过程中一个的谜。根据 SSU 树（图 14.20a），这些早期的真核生物是微小的（2～5μm）寄生细胞，其结构比其他无线粒体的真核生物更简单。微孢子虫如脑炎微孢子虫属没有任何细胞器，甚至没有高尔基复合体和氢化酶体（不知纺锤剩体是否存在），仅含有极小的基因组。脑炎微孢子虫的基因组，只有 2.9Mb，比细菌的大肠杆菌（*Escherichia coli*）的基因组小 1.5Mb！的确，微孢子虫具有某些特征的组合，这些特征被认为存在于“原始”的真核生物中，微孢子虫在 rRNA 树的位置也确认了这一点（图 14.20a）。

然而，微孢子虫在 SSU 树的位置被一些人置疑，因为这类生物的 rRNA 明显经历了非常快的进化（图 14.20a 中，树中的长分枝暗示了这一点）。这一事实被认为是在树中定位这类生物体时引入了人为产物。为了解决这个问题，对线粒体的基因和蛋白质以及其他无线粒体的真核生物的基因和蛋白质进行了相应的序列分析，得到了另一个版本的进化程序，与刚才我们所讲的差异极大。

真核生物进化的另一个观点

序列分析表明由某些真核生物的基因和蛋白质分子所形成的进化树与来自基于 rRNA 的进化树是显著不同的（图 14.20b）。采用一些分子的序列来构建这些进化树，这些分子包括微管蛋白、RNA 聚合酶和 ATP 酶亚基等分子。但最为关键的信息来自热休克蛋白和相关的伴侣蛋白的蛋白质序列（见 7.17 节和 8.9 节），这些蛋白质被认为像 rRNA，是极好的进化标记。这些真核生物进化树与 SSU rRNA 进化树相比如何呢？

第一，在 SSU rRNA 进化树中的一个突出的特征——从最原始的生物如贾第鞭毛虫到多细胞的生物冠，这样的进化阶梯（图 14.20a）——消失了。实际上，另一种进化树显示出真核生物的主要辐射进化几乎是同时的；这种辐射包括了现已知的绝大部分真核生物（图 14.20b）。尽管与进化树的“世袭路线”（14.20a）相比，辐射型进化图不太令人满意，但它是目前能说明分子序列数据的图谱。第二，在另一种进化树中，动

物和真菌的亲缘关系很近。第三，微孢子虫，在 SSU 树的分枝很早，显示出与高度进化的真菌有特异的关系（图 14.20）。有趣的是，微孢子虫是以小的感染性的孢子样结构来遗传，这样的结构在某些方面和真菌孢子相似。对热休克基因的研究使得真菌和微孢子虫之间的联系更为紧密，如在脑炎微孢子虫属中也检测到细菌热休克基因（与来自线粒体的基因相似)。这一证据有力地暗示这种生物曾经拥有线粒体。

我们从这两种极不相同的真核生物系统发育图中能得出怎样的结论呢？其一，我们认为描绘真核生物的真实的系统发育是一个正在进行的工作。换一句话，图 14.20 显示的两种进化树都不能被认为是真核生物系统发育的“终结版”。两种进化树的分歧反映出，在真核生物进化史中仍有许多细节以及不同分子的进化信息都是我们所不能理解的。当更多的序列比对结果到手后，结合其他的研究（如前面提到的纺锤剩体的发现）将揭示出真核生物学的新章节，真核生物的真实进化树终会形成。微生物学家一致认为 SSU rRNA 进化树和另一种进化树都会提供一些答案，将会依据这些进化树的观念而绘出最终的真核生物系统发育图谱。

既然我们已经领悟了真核微生物的进化以及这方面的许多无法回答的问题，让我们继续思考这些生物体，就从原生动物开始吧。

概念检查

根据 rRNA 序列分析，真核生物细胞形成它们自己的主要进化世袭路线（真核界)。一些真核微生物，如贾第鞭毛虫和毛滴虫是早期分支的种，而真核生物进化树的“冠”含有多细胞的植物和动物。基于其他的基因和蛋白质序列比对的进化树，给出另一个十分不同的进化图。

◆ 从细胞的观点看，划分真核生物为五界有什么错误？

◆ 总结证据证明：与人细胞相比，生物体贾第鞭毛虫是原始真核生物的近亲。

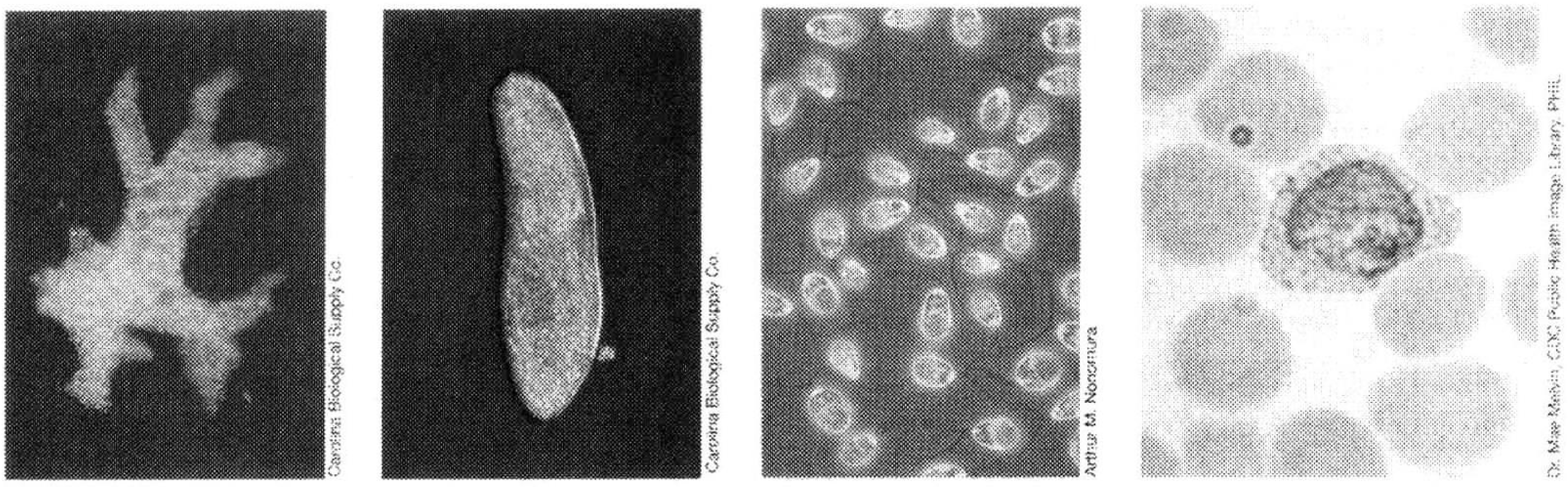
◆ 真核生物的另一种进化树与 SSU rRNA 进化树有何本质不同？

14.10 原生动物

主要属：变形虫属（*Amoeba*)、草履虫属（*Paramecium*)、锥体虫属（*Trypanosoma*)

原生动物（protozoa）是无细胞壁的单细胞真核微生物（图 14.21），它们通常是无色和能运动的。原生动物以其具有真核性质和明显大得多的个体有别于原核生物（prokaryote)；以无叶绿素有别于藻类（algae)；以能运动和多数情况下又无细胞壁有别于酵母菌（yeast）和真菌（fungi)；以不产生子实体有别于黏菌（slime mold)。正如前面所述，原生动物从系统发育上看，与真核生物系统发育树中绘出的每条进化路线均有所不同（图 14.20)。

原生动物多分布在淡水和海水中，有些寄生在其他动物体和人体上，还有一些生活在土壤中或者在有空气的地方，如树皮表面。多数原生动物通过摄食颗粒状物质来获取食物，也有些细胞是通过吞噬作用（phagocytosis）取食，这个过程是：以一部分柔软的细胞膜裹住食物颗粒再将其吞入，然后进入细胞内。有些原生动物能够用一种称为



(a) (b) (c) (d)

图 14.21 典型的原生动物。 (a) 阿米巴变形虫 (*Amoeba*)。(b) 一种典型的纤毛虫，草履虫 (*Paramecium*) (同见图 14.25)。(c) 一种鞭毛虫，杜氏藻 (*Dunaliella*) (这种鞭毛虫具有叶绿体，也被认为是一种藻类)。(d) 间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)，一种顶复门 (apicomplexan) 孢子虫 (sporozoan)，在人血红细胞中生长。

口腔 (gullet) 的专门结构准确地吞咽颗粒状物质 (如细菌细胞) (图 14.25)。

为了适应"捕捉"食物，许多原生动物是运动的，运动的方式被作为原生动物分类的关键特征 (表 14.1)。以变形虫方式运动的原生动物叫做肉足亚门 (Sarcodina)；用鞭毛运动的是鞭毛总纲 (Mastigophora)；以纤毛运动的叫纤毛门 (Ciliophora)；第四类是顶复门 (Apicomplexa)。它们一般是不运动的，且都寄生在高等动物体内。

表 14.1 原生动物主要类群的特征

类群	名称	代表种	栖息地	病害
鞭毛总纲 (Mastigophora)	鞭毛虫(Flagellate)	锥体虫(*Tryanosoma*)、贾弟鞭毛虫(*Giardia*)、利什曼原虫(*Leishmania*)、毛滴虫(*Trichomonas*)	淡水、动物寄生虫	非洲睡眠病、贾弟虫病、利什曼原虫病
眼虫类[a] (Euglenoids)	光合鞭毛虫 (phototrophic flagellates)	眼虫(*Euglena*)	淡水、某些海洋	不致病
肉足亚门 (Sarcodina)	阿米巴变形虫 (Ameba)	阿米巴变形虫(*Amoeba*)、内变形虫(*Entamoeba*)	淡水和海洋，动物寄生虫	阿米巴痢疾、内变形虫病
纤毛门 (Ciliophora)	纤毛虫 (Ciliate)	肠袋虫(*Balantidium*)、草履虫(*Paramecium*)	淡水和海洋，动物寄生虫，瘤胃	痢疾
顶复门 (Apicomplexa)	孢子虫 (Sporozoan)	疟原虫(*Plasmodium*)、弓形虫(*Toxoplasma*)	早期动物寄生虫、昆虫(寄生疾病的媒介)	疟疾、弓形虫病

a. 这个类群也被认为是藻类(见 14.13 节和表 14.3)。

鞭毛总纲：鞭毛虫

这类原生动物通过鞭毛的活动进行运动，因此统称为鞭毛虫 (flagellate) (图 14.21c 和图 14.22)。生有鞭毛的原生动物遍布 rRNA 进化树，从早期的生物体如贾弟鞭毛虫，到眼虫类和腰鞭毛虫类 (dinoflagellate) (图 14.20a)。真核微生物因其在栖息地上的多种运动方式，而形成真核微生物巨大的多样性。

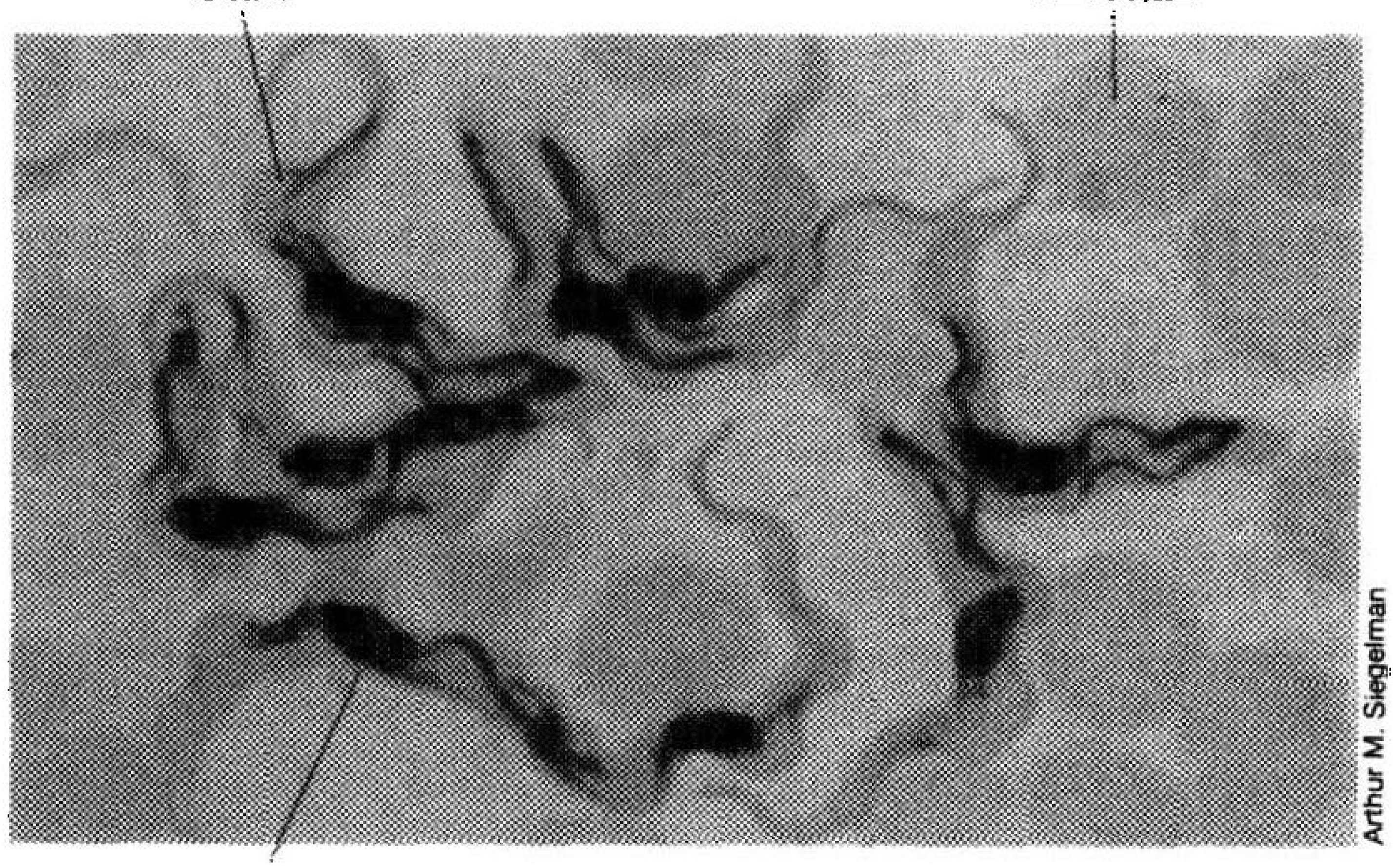


图 14.22　锥体虫（trypanosomes）。具鞭毛的原生动物布氏锥体虫（*Trypanosoma brucei*）的光学显微镜照片，引起非洲睡眠病的病原体的血涂片。

虽然许多具鞭毛的原生动物是自由活动的生物体，但有些是寄生的或是使动物和人类致病的。最重要的致病性鞭毛总纲原生动物是锥体虫（trypanosomes），这类生物能引起人类和脊椎动物的许多严重疾病，包括非洲睡眠病（African sleeping sickness）。感染人的锥体虫很小，大约 20μm 长，呈纤细的新月形，具有一根从基体产生的反过来又穿过细胞侧面的单鞭毛，它被包在膜表面的活瓣内（图 14.22）。鞭毛和膜都参与运动，即使在很黏稠的血液中也能很有效地运动。

布氏锥体虫（*Trypanosoma brucei*）是引起慢性的但常常是致命的非洲睡眠病的物种。这种寄生虫最初生长在人的血液中，后期侵入中枢神经系统。引起脑和脊髓的炎症，这是导致此病神经系统特殊症状的原因。这种病通过舌蝇（*Glossina* sp.）——只在非洲某些地区出现的吸血蝇，从一个人传染到另一个人体内。布氏锥体虫在舌蝇的肠道内增值，然后侵入舌蝇的唾液和口器，经叮咬传染给另一个人。

其他的寄生鞭毛虫包括毛滴虫，一种人类性传播的病原体（见 26.13 节）。这种 parabasilid 原生动物［因其有一个副基粒或副基体（parabasal body）而得名，除了其他的功能，还对高尔基体起结构性支撑作用］生活在脊椎动物和无脊椎动物的肠道和泌尿、生殖道内。毛滴虫的许多种寄生在白蚁和其他昆虫的后肠（见 19.10 节）。有些鞭毛类原生动物甚至是光合营养的（phototrophic），这类生物是含有叶绿体、进行光合作用生长的眼虫。但在黑暗中，眼虫藻属（*Euglena*）动物（一个典型的眼虫）的细胞（图 14.33a），也能以一种化能营养型（chemoorganotroph）的方式生长。同样地，从表型上这些生物体和鞭毛类原生动物难以区分开。我们已经了解了许多眼虫，它们全部是水生的，主要栖息在淡水中，但与其他的鞭毛类原生动物不同，眼虫是不致病的（见 14.13 节）。

肉足亚门：变形虫

肉足亚门中都是像变形虫（*Amoeba*）和有孔虫（foraminifera）那样的生物，变形虫在营养阶段是裸露的，在营养生长时分泌一个外壳（图 14.23a）。变形虫是一种淡水生物，它的细胞壁厚度变化范围较大，可从 15μm（在显微镜下清晰可见）到 750μm

（几乎肉眼可见）。

有壳的肉足虫生出各种令人感兴趣的外壳，人们了解得最为清楚的是有孔虫的壳。有孔虫是专门生活在沿海水域的海洋生物，它们的壳叫做介壳（test），不同种的壳有明显的特征，常常是很美丽的（图 14.23）。介壳通常是由硅酸盐构成的，细胞往往不是很牢固的附着在壳上，当捕食时变形虫会伸出壳外。因为介壳有一定的重量，所以细胞常常沉在海底，以捕食沉淀的颗粒，主要是细菌和腐质。有孔虫的壳不易腐烂，可形成化石（例如，英格兰多佛的白峭壁就是由有孔虫的壳沉积在古代的海床形成的）。这些生物留下了出色的化石记录，我们对它们在地质年代中分布的了解比其他任何原生动物都要多。

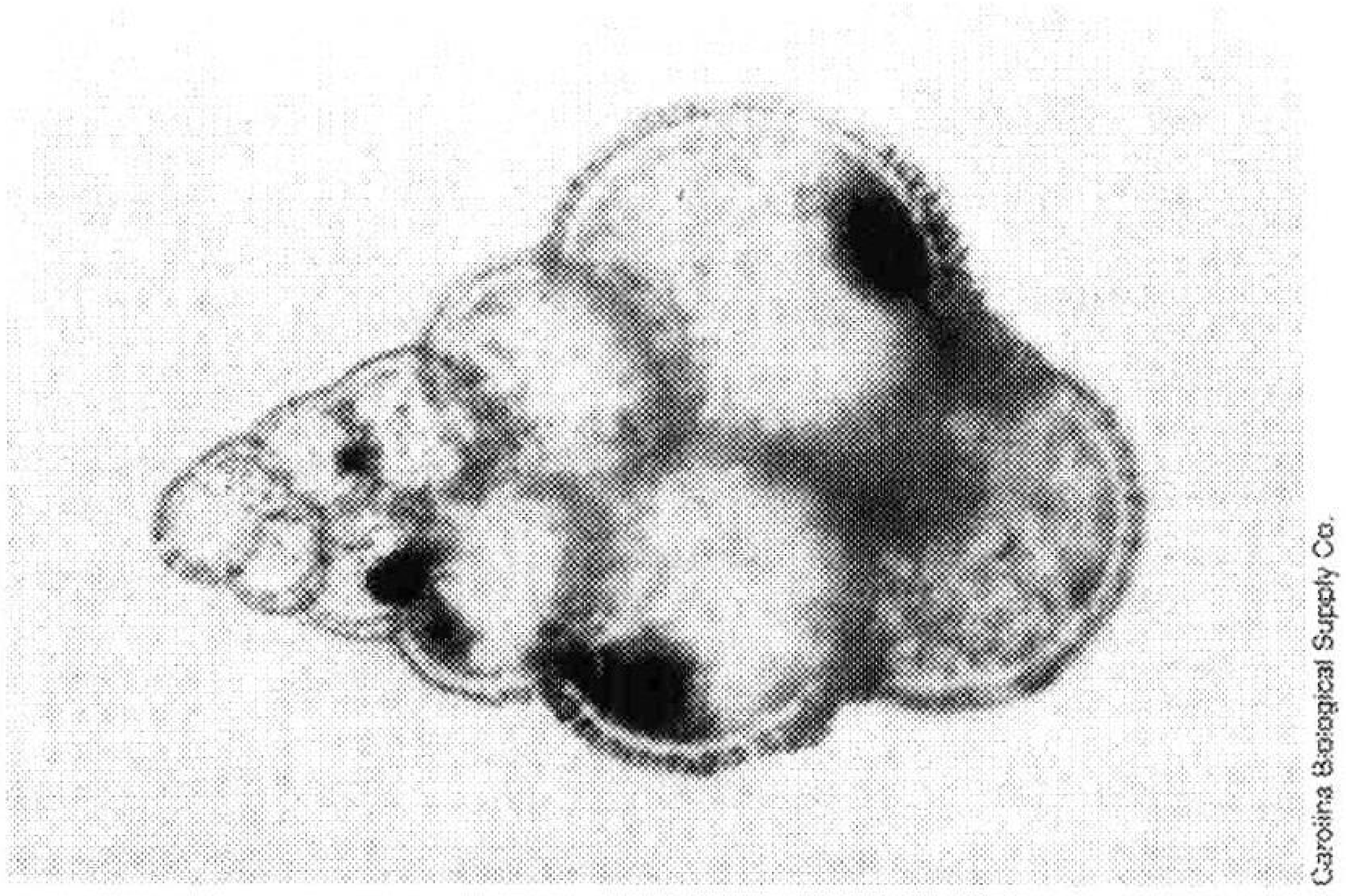


图 14.23 有壳变形虫：有孔虫。注意华丽分段的（multilobed）介壳。

致病性变形虫

许多种无壳的变形虫是人类和脊椎动物体内的寄生虫，它们经常生活在口腔或肠道内，在其栖息地以变形运动（amoeboid movement）（图 14.24）方式进行运动，非细胞

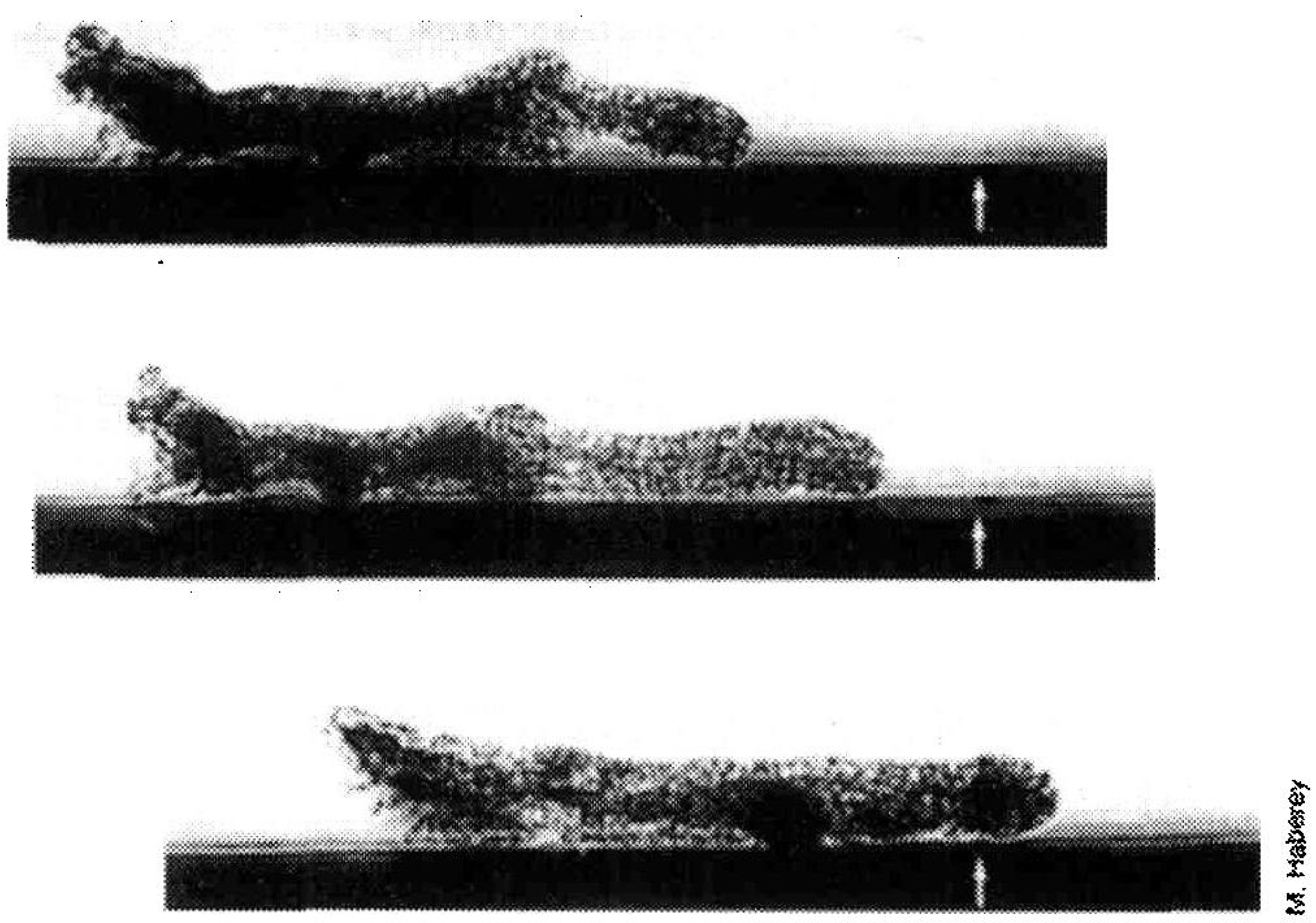


图 14.24 运动的变形虫侧面观，大变形虫（*Amoeba proteus*）的胶片。上一张和下一张胶片之间间隔的时间为 6s。箭头指向表面的一个固定点。单个细胞直径约为 80μm。

型黏菌也采用这种运动方式（见 14.11 节）。痢疾内变形虫（*Entameoba histolytica*；图 28.13）是寄生变形虫的代表，很多情况下人受感染后没有明显的症状，但会使某些人的肠道产生溃疡并引起腹泻，即阿米巴痢疾（amebiasis）。这种寄生虫通过被粪便污染的水和食品以囊体的形式从一个人传染给另一个人。我们将在 28.8 节讨论阿米巴痢疾的病原学和致病机制。

纤毛门：纤毛虫

纤毛虫（Ciliate）是一类在它们生活的某一阶段具有纤毛（其功能在于运动性）的原生动物（图 14.25；又见图 14.21b）。它们是原生动物中唯一具有两种类型核的种类，小核（micronucleus）仅与遗传和有性生殖有关，而大核（macronucleus）只与 RNA 转录的产生或细胞生长和功能的各方面有关（图 14.26）。

分布最广泛、最著名的纤毛虫是草履虫属的成员（图 14.25），现将它作为这个类群的代表介绍。大多数纤毛虫类是通过明显的口器或是下面连有食道的口来吞食颗粒状食物（图 14.25b），进入口之后的食物颗粒被送到食道下面，在细胞质中形成一种食物泡，食物泡可分泌消化酶。

除具有运动功能的纤毛外，许多纤毛虫还有丝胞（trichocyst）。丝胞是细长的、具有收缩性的丝状物，锚定在细胞层的外表面。它能使原生动物附着一表面物并指示细胞正受到掠夺者的攻击，以此刺激细胞防御进行自我保卫。捕食性的纤毛虫如栉毛属（*Didinium*）的丝胞可以抓住小动物并在吞食前将其麻痹。

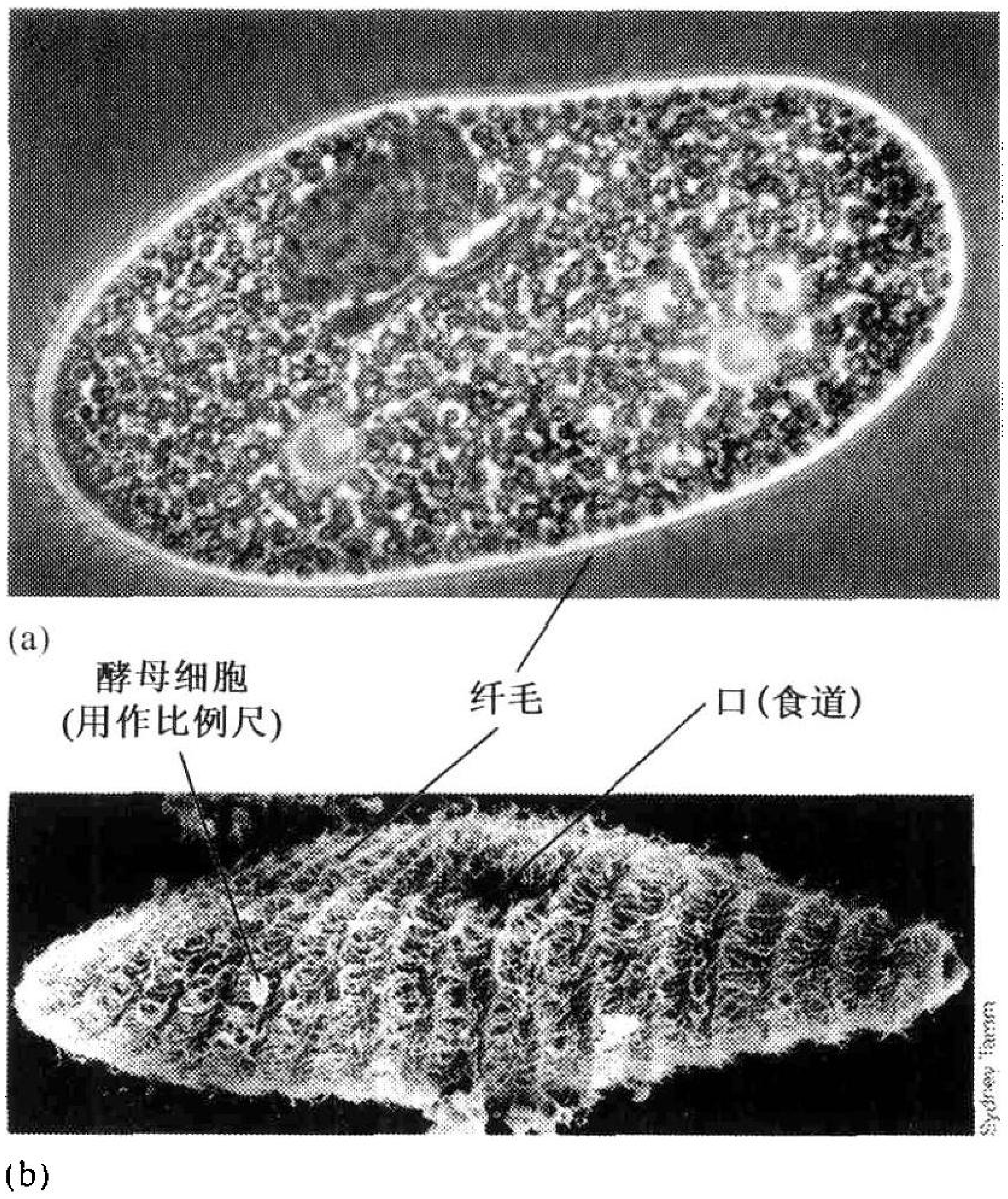


图 14.25　草履虫，一种具纤毛的原生动物。（a）显微照片。（b）扫描电镜照片注意比较两张照片上的纤毛。单细胞草履虫细胞直径约 60μm。

多种草履虫（还有许多其他的原生动物）的细胞质或大核内寄宿着内共生细菌。已经证明这些内共生细菌对宿主有营养功能，可以为草履虫合成维生素或其他生长因子，否则草履虫只能从环境中去获取这些物质。在白蚁肠道中生活着的纤毛类原生动物，其体内的内共生产甲烷菌可以将在氢化酶体（图 14.4）内丙酮酸盐氧化产生的 H_2 转化成甲烷并将其释放到大气中（见 19.10 节和图 19.26b、c）。

虽然少数的纤毛虫可寄生在动物体内，但纤毛虫的这种寄生方式不如在其他的原生动物类群中那样普遍。大肠袋虫（*Balantidium coli*）（图 14.26）原是家禽的寄生虫，但是偶尔也可以感染人，在肠道内引起与痢疾内变形虫相同症状的肠道痢疾。此外在反刍动物的前胃——瘤胃（见 19.11 节）中，专性厌氧的纤毛虫通常是作为一种特征性的动物区系，这些原生动物在瘤胃中食物的消化和发酵过程中起着有益的作用。

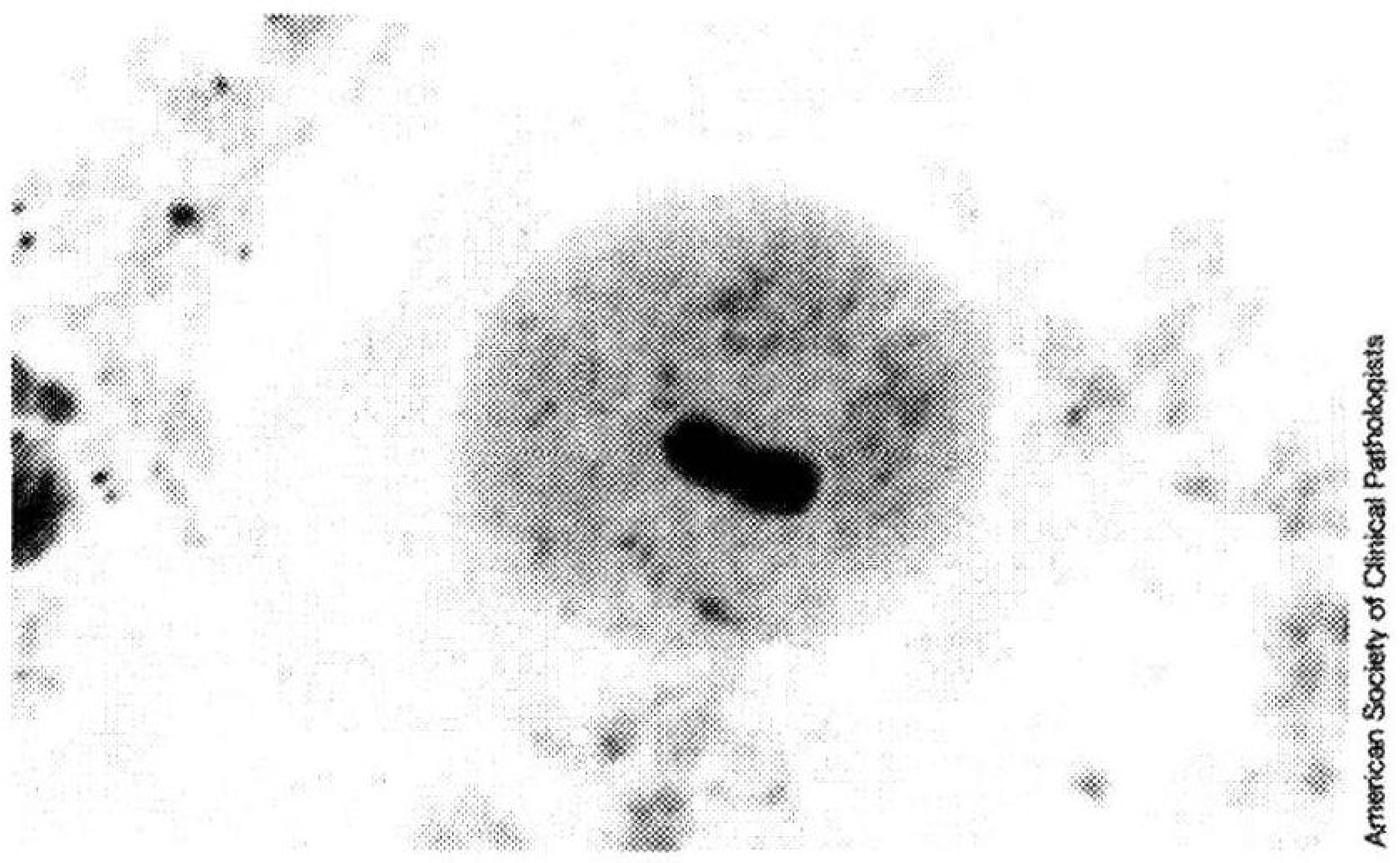


图 14.26　大肠袋虫，一种具纤毛的原生动物，能引起人类类似痢疾的疾病。
被染为深蓝色的结构是大核。

顶复门（孢子虫）

顶复门（Apicomplexa）也称孢子虫（Sporozoans）（图 14.21d）是一个大类群，是专性寄生的原生动物。顶复门的寄生虫导致疟疾［各种疟原虫（*Plasmodium*）］、弓形虫病［弓浆虫属（*Toxoplasma*）］和球虫病［艾美球虫属（*Eimeria*）］之类的严重疾病。它们的特点是缺少游动的成熟期；其营养方式同原核生物、真菌一样，通过膜以可溶形式吸收营养。虽然孢子虫这个名词表示形成孢子，但这类生物不像细菌、藻类和真菌那样产生真正的休眠孢子，只是生成另一种同功结构——子孢子（sporozoite），它可以被传播到新的寄主体内。

许多脊椎动物和无脊椎动物都是孢子虫的寄主，有时孢子虫有转寄主现象，生活循环的某个时期在一个寄主体内，而另一个时期在另一个寄主体内。最重要的孢子虫是球虫（coccidia），它是鸟类的寄生虫，而疟原虫（哺乳动物寄生虫）（图 14.21d），不但感染了鸟类和哺乳动物，也感染人类。疟疾是人类的一种重要的疾病，尤其是在发展中国家。有关这种疾病和疟原虫的特征将在 27.5 节中进行专门讨论。

有趣的是，顶复门寄生虫有一个质体称作 aplicoplast。质体是退化的叶绿体，缺乏色素和叶绿体的光合能力。然而像叶绿体一样 aplicoplast 有自己的基因组表达一些基因。aplicoplast 的主要功能是在核内编码的，这一点类似于线粒体。aplicoplast 执行脂肪酸、异戊间二烯化合物（isoprenoid）和亚铁血红素（heme）的生物合成，并且将它

们的产品输出到细胞质。aplicoplast 被认为起源于 apicomplexan 内共生吞入的红藻细胞，其叶绿体最终退化，在 apicomplexan 体内起着非常专业的非光合合成作用。

概念检查

原生动物是缺乏细胞壁并通常以各种方式进行运动的单细胞真核微生物。许多原生动物是人和其他动物的病原体。

- *列出草履虫与锥体虫至少两种重要的区别。*
- *孢子虫与其他原生动物有何区别？*
- *为什么眼虫藻也被认为是原生动物？*

14.11 黏菌

主要属：网柄菌属（*Dictyostelium*）、绒泡菌属（*Physarum*）

黏菌（slime mold）是微小的真核生物，与真菌和原生动物均具有表型上的相似性。黏菌与真菌（见 14.12 节）一样，有一个生活史，能产孢子。然而黏菌能运动，像原生动物（见 14.10）一样，可以非常迅速地在固体表面移动（图 14.27～图 14.29）；用系统发育的眼光来看，黏菌和变形虫类原生动物有亲缘关系（图 14.20a）。

黏菌分为两个类群：细胞黏菌（cellular slime mold），其营养体形式是由单个变形虫组成；非细胞黏菌（acellular slime mold），它的营养体的大小和形状不固定，是原生质团［称为变形体（plasmodia）］（图 14.27）。黏菌主要生活在腐烂的植物基质上，如枯枝落叶、木头，以及土壤中。它们的食物主要是其他的微生物，特别是细菌，黏菌以吞噬方式摄食。黏菌能维持自身长期处于营养态，但最终形成分化的孢子样结构，这一结构可以仍然保持休眠状态，然后再次萌发生成活跃的变形虫。

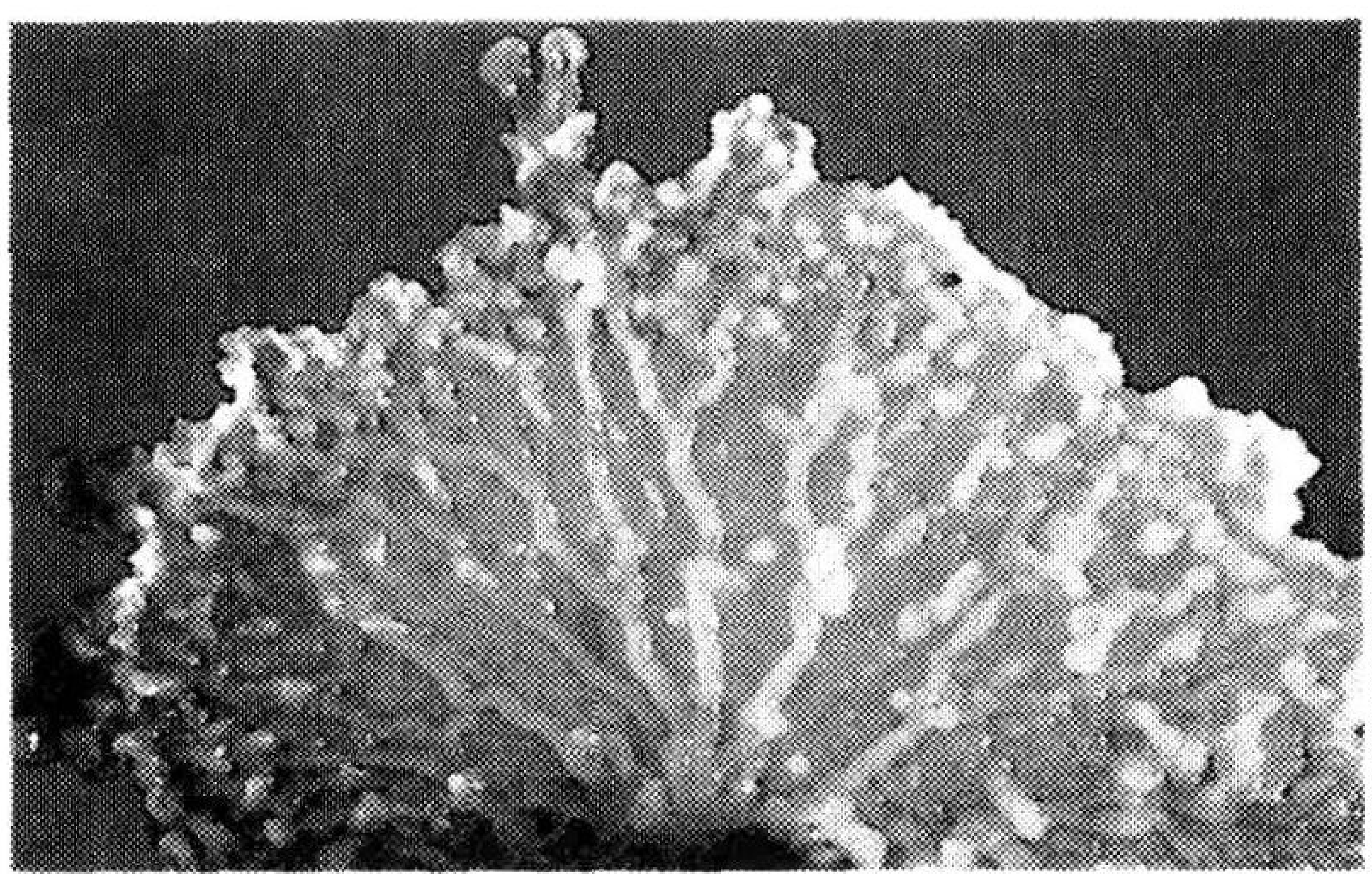


图 14.27　细胞黏菌。生长在琼脂表面的非细胞型黏菌绒泡菌属（*Physarum*）的原生质团。

非细胞型黏菌

营养时期的非细胞型黏菌，如绒泡菌属，像一个不定型的扩展的原生质团（图

14.27)。这一结构在基质表面呈活跃的变形运动，并在运动时吞食颗粒状食物。变形运动是细胞质流动的结果，因为变形体顶端的收缩和黏性较弱，细胞质就向前选择阻力最小的途径，所以细胞质向前流动。

细胞质的流动由微丝促进，微丝存在于真核生物细胞质膜下面的薄层中（见 14.4 节和图 14.1 和图 14.9)。在非细胞黏菌中细胞质流动呈现出明显的束，每一束都裹着一层薄的细胞质膜（图 14.27)，流动本身是一个分配细胞代谢的机制。

非细胞形黏菌的原生质团在遗传学上是双倍体，它可以产生孢子囊和单倍体的孢子。在适宜的条件下，孢子萌发生成单倍体游动细胞。两个游动细胞接合，就再次产生双倍体原生质团。

细胞黏菌：网柄菌属（*Dictyostelium*）

盘基网柄菌（*Dictyotelium discoideum*）是一种细胞黏菌，是研究微生物中细胞间的交流和合作的模式生物。它们具有一种有趣的生活史，在生活史中营养细胞聚集，像一个细胞团一样迁移并最后产生子实体。子实体内的细胞有差别，可形成孢子（图 14.28 和图 14.29)。当网柄菌的细胞饥饿时，它们聚集并形成一种假原生质团（pseudoplasmodium)，在其内细胞失去了它们的独立性，但并不融合。这种聚集现象由两种化合物引发，环一磷腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）和特异的糖蛋白。两者的功效是作为趋化性的介质（曾经在 8.7 节原核生物中，cAMP 在各种调节系统的

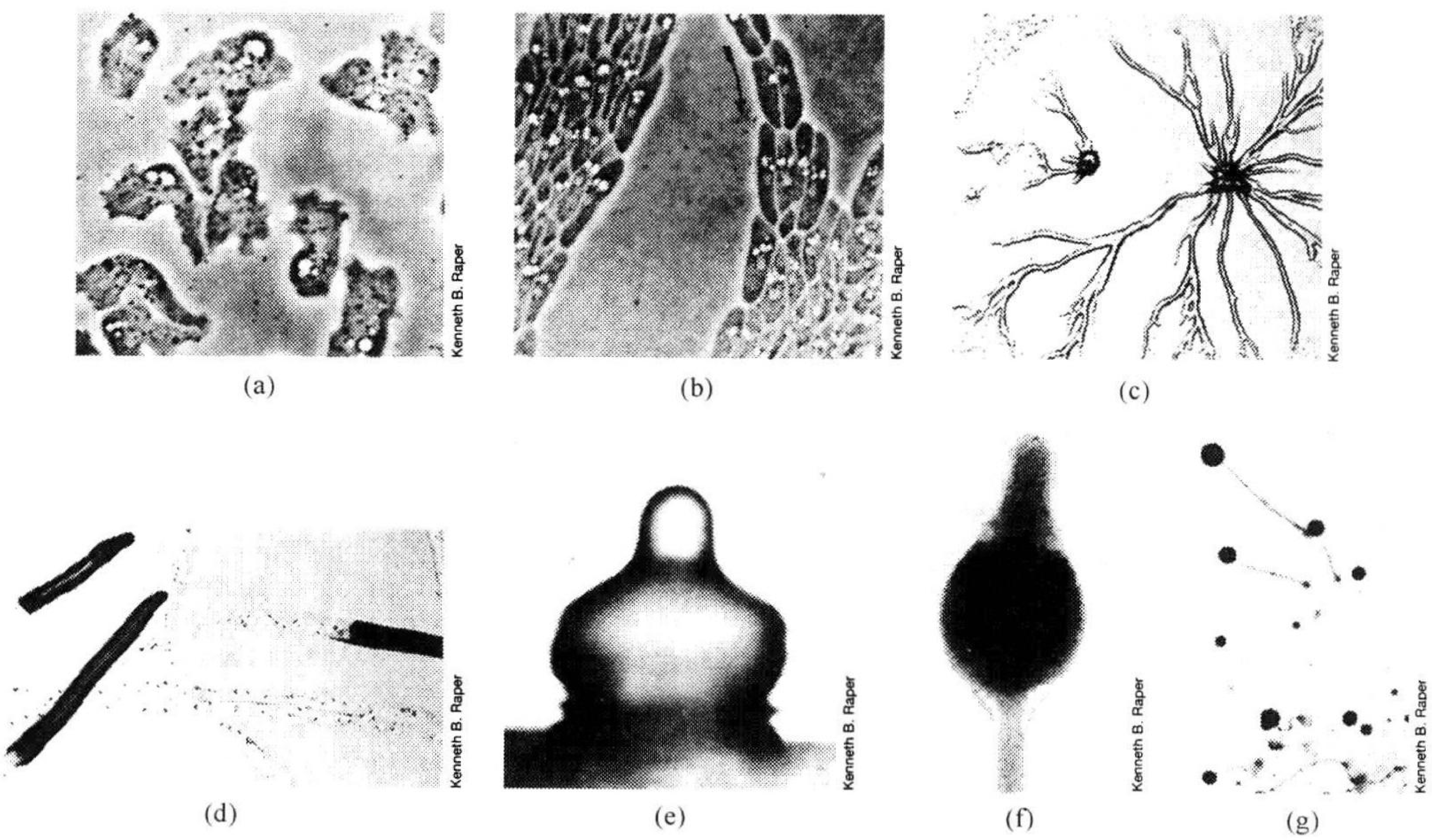


图 14.28 细胞黏菌——盘基网柄菌生活史各阶段的光学显微镜照片。 (a) 聚集前的变形虫体，注意不规则的形状并且无方向性。(b) 变形虫体聚集，注意规则的形状和方向性，细胞朝一个方向进行流动式运动。(c) 低倍镜下观察聚集的变形虫体。(d) 移动的假原生质团（蛞蝓型幼虫）在琼脂表面运动时留下了黏液状的痕迹。(e，f) 子实体的早期阶段。(g) 成熟的子实体，其大小和结构见图 14.29。

作用中讨论过），这些细胞首先产生这两种化合物成为吸引其他的营养细胞的中心，导致聚集成细胞团并形成一种黏液状可移动的团，蛞蝓型幼虫（slug），人们常俗称之为鼻涕虫。

当蛞蝓型幼虫停止移动并变为垂直方向生长时开始形成子实体（图 14.28 和图 14.29）。子实体分化为柄和头部，蛞蝓型幼虫前端的细胞变成柄细胞，后端的细胞形成孢子。形成柄的细胞开始分泌纤维素使柄变硬，后端的细胞爬到柄的顶端形成头部。大多数后端的细胞分化成孢子，头部完全成熟后，孢子被释放并散播，每一个孢子都能萌发，而后形成一个营养的变形虫体。

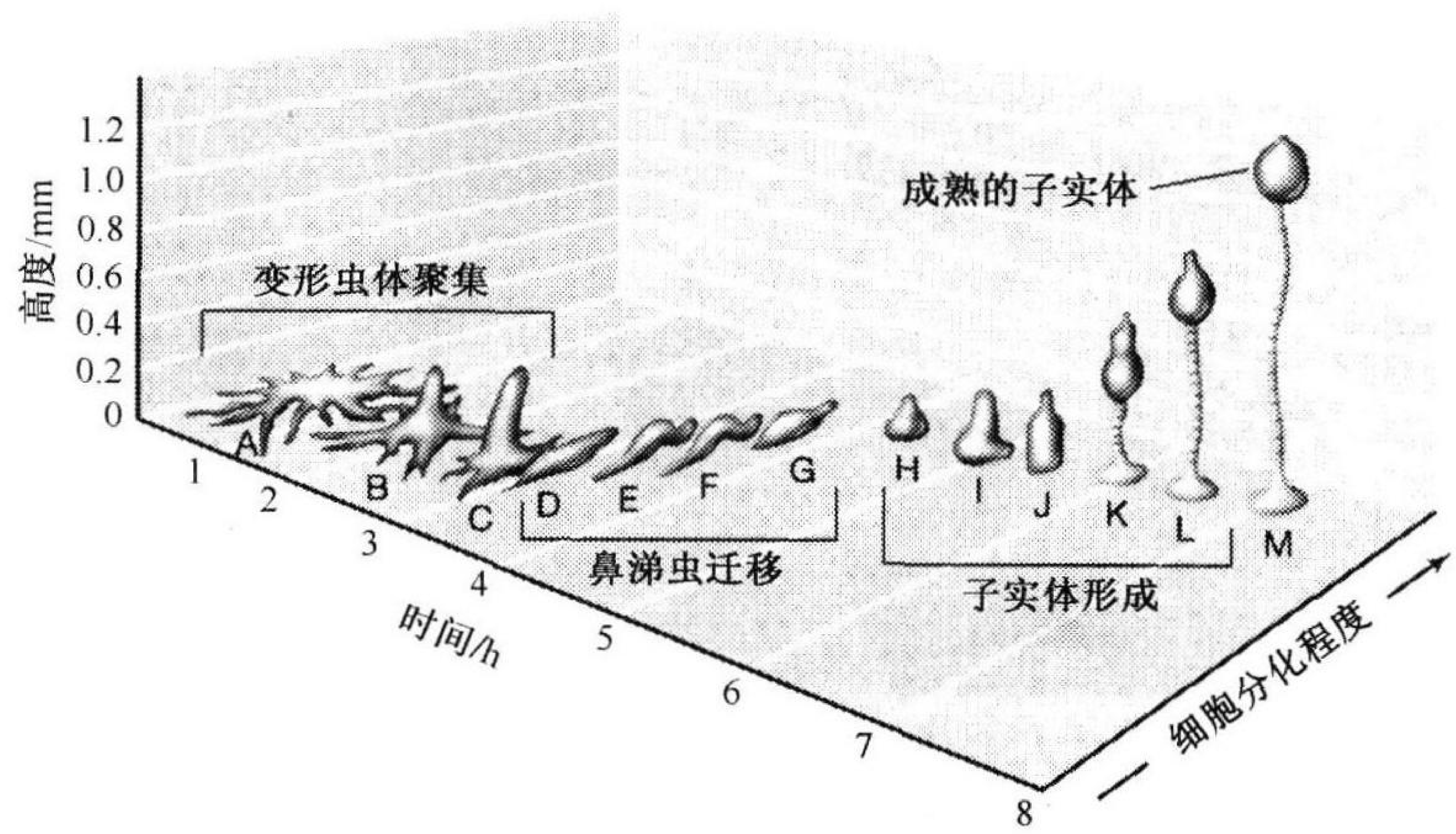


图 14.29　细胞黏菌——盘基网柄菌形成子实体的过程。（A～C）变形虫体聚集。（D～G）从聚集的变形虫体形成可移动的蛞蝓型幼虫。（H～L）向上形成子实体。（M）子实体成熟。

子实体和孢子形成的循环在网柄菌中是一个无性（asexual）的过程。然而一种被称为大孢囊（macrocyst）的有性（sexual）孢子也能由这类生物产生。大孢囊是由变形虫体聚集形成的，并裹以纤维素壁。两个变形虫体接合后发育成一个单个的大变形虫体，继续吞噬周围其他的变形虫体。这时，在巨大的变形虫体周围产生厚的纤维素壁，形成一个成熟的大孢囊，它可长期保持休眠。最终，这个双倍体核经减数分裂形成单倍体核，形成一个新的变形虫体，重新开始营养生长（图 14.28 和图 14.29）。

概念检查

非细胞型黏菌是运动的原生质团，而细胞型黏菌是各个细胞聚集在一起形成子实体，孢子由子实体释放出来。

◆ 描述盘基网柄菌（*Dictyotelium discoideum*）生活史中的主要步骤。

◆ 什么是大孢囊（macrocyst）？

14.12 真菌

主要属：青霉属（*Penicillium*）、曲霉属（*Aspergillus*）、酵母属（*Saccharomyces*）、假丝酵母属（*Candida*）

同原生动物相比，真菌有许多不同之处，它们具有细胞壁，并产孢子。无论是SSU rRNA进化树还是基于其他分子的进化树（图14.20），真菌都形成一个紧密的系统发育簇。真菌分为3个主要类群：霉菌（mold）、酵母菌（yeast）和蘑菇（mushroom）。

真菌的栖息地非常广泛，已知的某些种是水生的，主要生活在淡水中，少数生活在海洋中。然而，大多数真菌的栖息在陆地上，主要生活在土壤或者是在已死的植物体上，并且这些种类在自然界有机碳的矿化中起着重要的作用。许多真菌是陆地植物的寄生菌，事实上真菌是引起作物病害，造成经济上严重损失的主要原因。少数真菌是动物，包括人类的寄生菌。然而，一般真菌作为动物病原体不如其他微生物重要（见27.8节有关病原真菌的讨论）。

细胞壁和新陈代谢

真菌的细胞壁只是在构造上类似于植物的细胞壁，但在生物化学上有区别。虽然植物细胞壁的多糖纤维素存在于某些真菌的细胞壁中，但是多数真菌的细胞壁含有壳多糖（chitin），又称几丁质，糖衍生物的一种聚合体——*N*-乙酰氨基葡萄糖（图3.5）。几丁质存在于微原纤维束内，类似于纤维素。其他的多糖，如甘露聚糖、半乳聚糖和壳聚糖可替代几丁质存在于某些真菌的细胞壁中。

真菌的细胞壁通常含有80%～90%的多糖，与蛋白质、类脂、多聚磷酸盐、无机离子一起构成壁-黏合模型。由于真菌具有广泛的生物应用前景，理解真菌细胞壁的化学性质是重要的。真菌细胞壁的化学性质被用于分类研究和工业开发。

所有的真菌都是化能有机营养类型，营养要求一般很简单。许多真菌能在极端低的pH或高温（高达62℃）环境中生长，这些特性和真菌孢子的独特性，使这类微生物通常污染食品、微生物的培养基和物体表面。霉菌和酵母并不是根据生理学的基础分类的，而是由其不同的生活史形式以及形成各种不同的有性孢子来分类的（表14.2）。

表14.2 真菌的分类和主要特征[a]

类群	名称	菌丝	代表种	有性孢子类型	栖息地	病害
子囊菌纲（Ascomycetes）	子囊真菌（sac fungi）	有隔	脉孢菌（*Neurospora*）、酵母菌（*Saccharomyces*）、羊肚菌（*Morchella*）	子囊孢子	土壤、腐烂的植物残体	荷兰榆树栗树枯萎，麦角，根
担子菌纲（Basidiomycetes）	珊瑚菌（club fungi）、蘑菇（mushrooms）	有隔	鹅膏菌（*Amanita*）（有毒蘑菇）、伞菌（*Agaricus*）（可食蘑菇）	担孢子	土壤、腐烂的植物残体	小麦锈病、玉米黑穗病
接合菌纲（Zygomycetes）	面包霉菌（bread molds）	多核	毛霉（*Mucor*）、根霉（*Rhizopus*）（通常面包霉）	接合孢子	土壤、腐烂的植物残体	食物腐败，包括少数寄生的病害

续表

类群	名称	菌丝	代表种	有性孢子类型	栖息地	病害
卵菌纲 (Oomycetes)	水生霉菌 (water Molds)	多核	异水霉属(*Allomyces*)	卵孢子	水中	马铃薯枯萎病、某些鱼病
半知菌纲 (Deuteromycetes)	半知真菌(fungi imperfecti)	有隔	青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、假丝酵母属(*Candida*)	未知	土壤、腐烂的植物残体、动物体表	植物枯萎、动物感染，如癣、足癣和其他半知菌病、表面或组织感染(假丝酵母)

a. 除了卵菌纲这一例外，真菌的系统发育形成非常密切的类群(图 14.20)。见图 14.30～图 14.34 中列出的许多生物的照片。

丝状真菌：霉菌

霉菌（mold）是丝状真菌（filamentous fungi），它们广泛分布在自然界，常见于变质的面包、奶酪和水果上，大多为专性需氧微生物。丝状体主要是通过末端细胞的延伸向顶端生长（图 14.30），单个的丝状体被称为菌丝（hypha）（复数，hyphae）。菌丝通常是沿一表面共同生长并形成细密的团状结合在一起，称为菌丝体（mycelium）（图 14.31），肉眼可见。菌丝体的形成是由个别的菌丝在生长时形成分枝，并且这些分枝缠绕，结果成为紧密的一团。在多数情况下，真菌菌丝的营养细胞含有一个以上的核——经常存在几百个核。因此典型的菌丝是多核的（coenocytic），为具核的管状，其内含有细胞质。

从真菌的菌丝体长出的菌丝分枝可以伸展到空气中，在这些气生的分枝菌丝上形成的孢子称为分生孢子（conidia）（图 14.30）。分生孢子是一种无性（asexual）孢子（它们的形成不涉及配子融合），通常高度色素化（图 14.31 和图 10.1a），能抵抗干燥，并且具有使真菌散播到新的生长栖息地的功能。当分生孢子形成时，白色的菌丝体发生变化，呈现分生孢子的颜色。它们可以是黑色、蓝-绿色、红色、黄色或者是褐色。这些

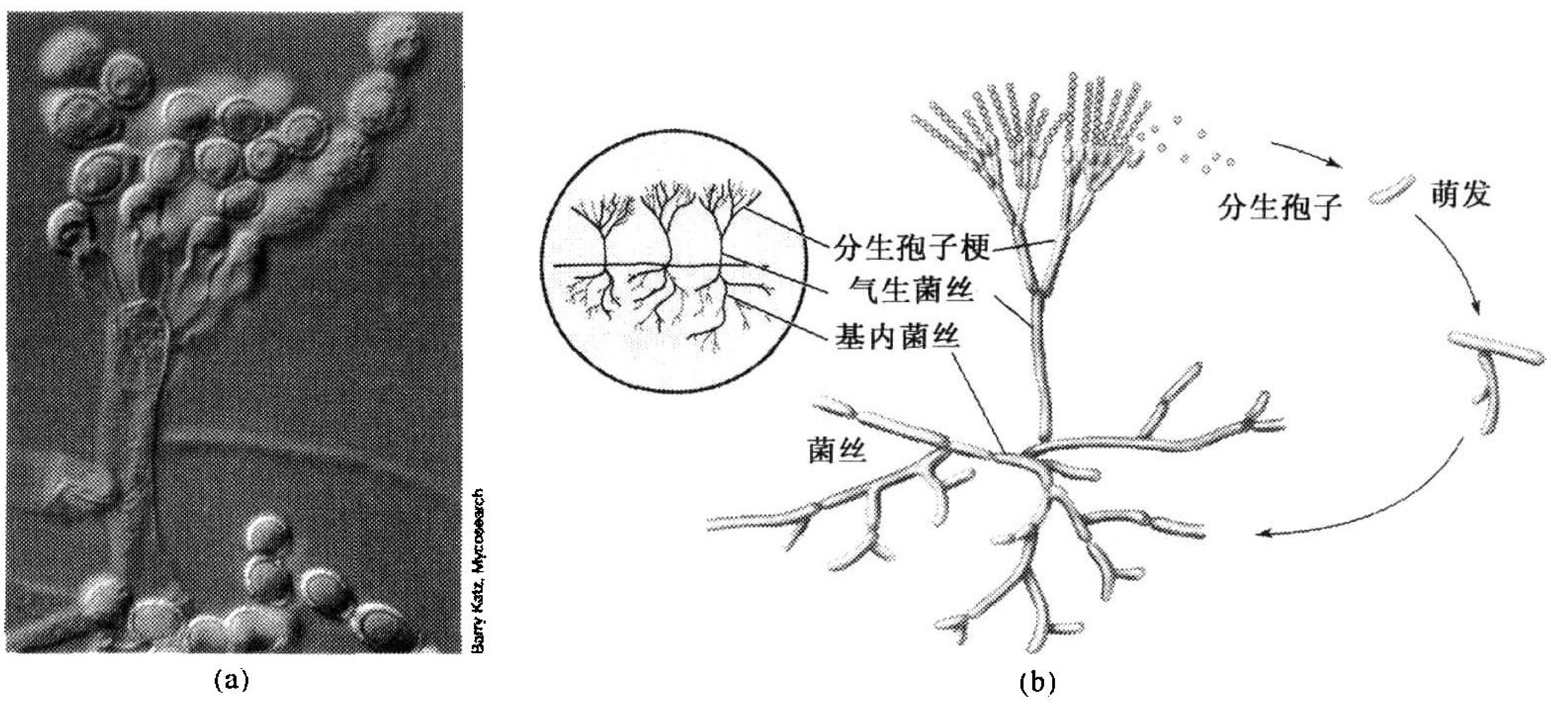
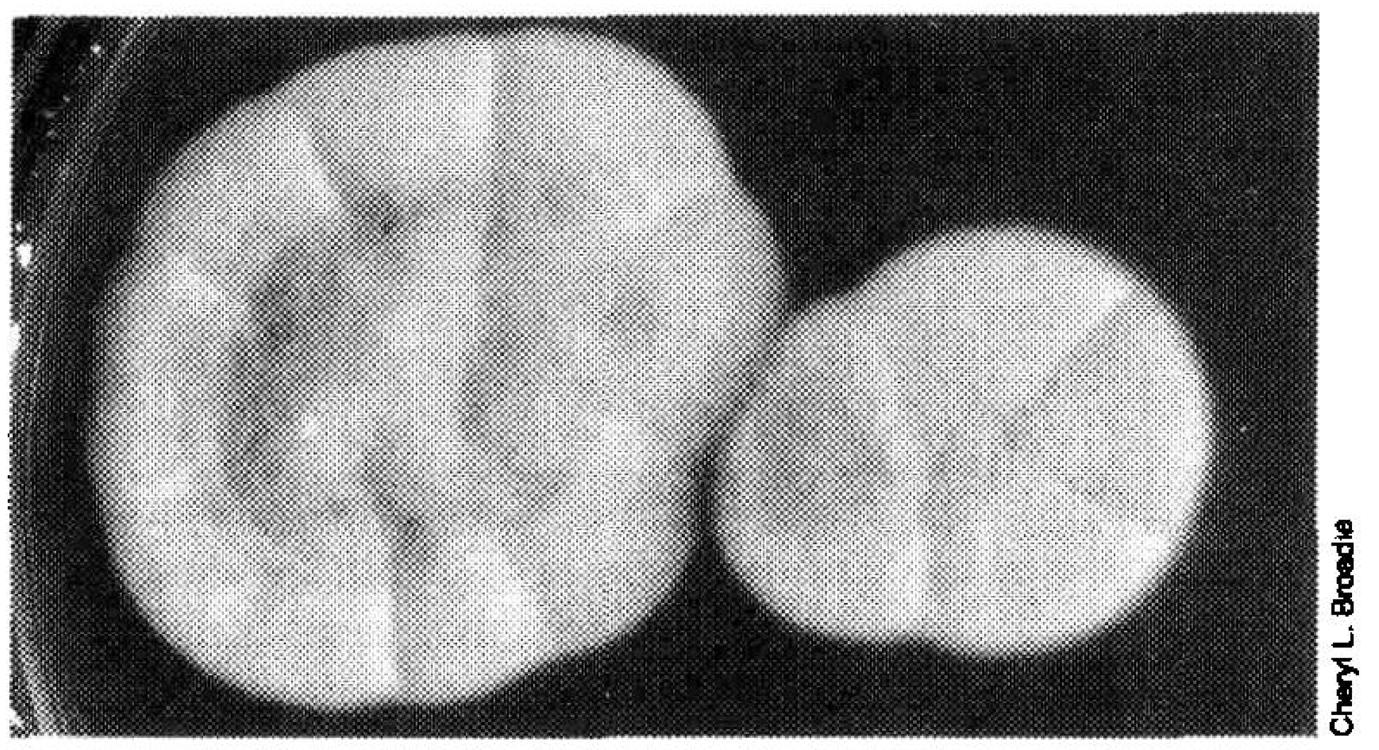
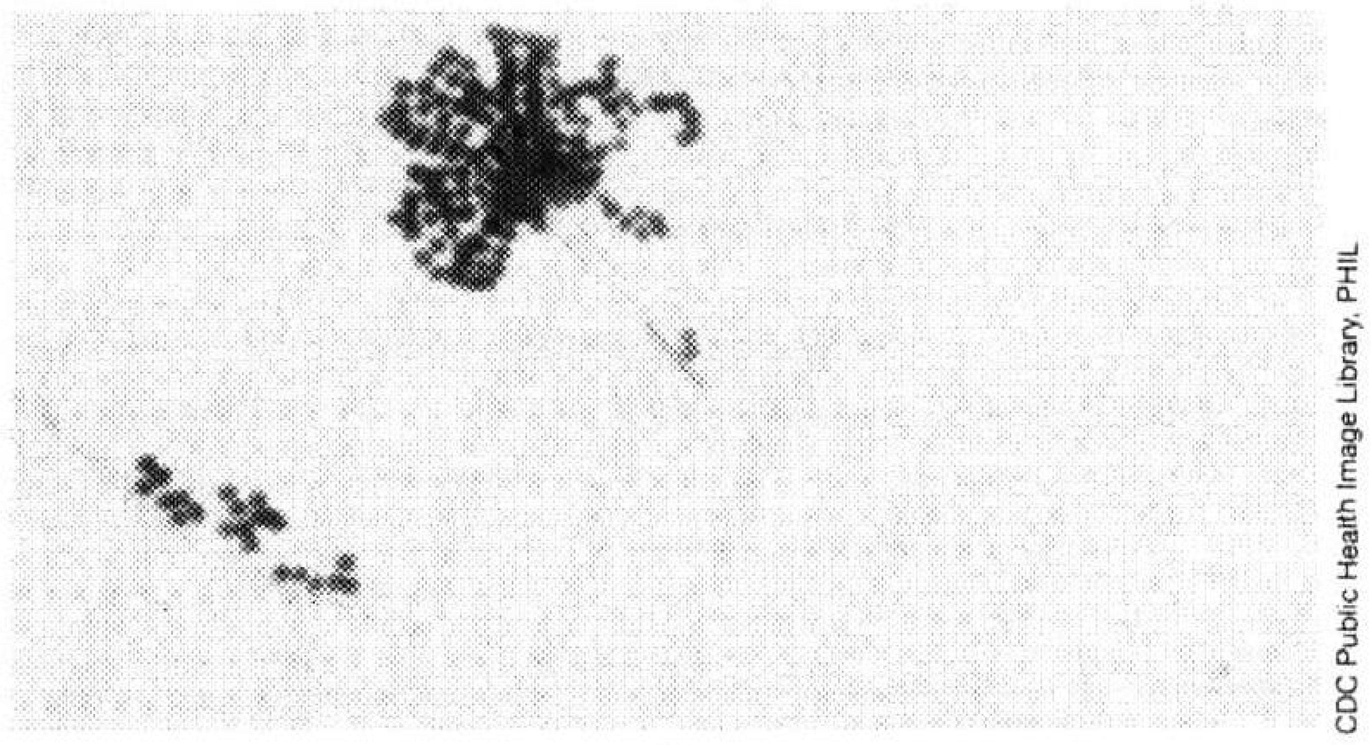


图 14.30　霉菌的结构与生长。（a）典型霉菌的光学显微镜照片，分生孢子呈圆形结构长在气生菌丝的末端。（b）霉菌生活史图，分生孢子可以经由风或动物传播。

孢子的出现使菌丝体团有点像粉尘的样子（图 14. 31a)。



(a)



(b)

图 14.31 真菌。（a）生长在琼脂板上的曲霉（*Aspergillus*）菌落，注意大量的丝状细胞（菌丝体）和无性孢子（图 14.30b）使菌落呈现灰尘粉末状。（b）烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）的分生孢子和分生孢子梗。

有些霉菌也能以有性繁殖的方式产生有性（sexual）孢子（表 14. 2)。有性孢子的出现是以单细胞的配子之间进行融合或者以称为孢子囊（gametangia）的特殊菌丝来产生的，二者择其一。有性孢子也可以源于两个单倍体细胞的融合，从而获得一个双倍体细胞。这个双倍体细胞经过有丝分裂和减数分裂产生单个的孢子。基于特定真菌所属的类群（表 14. 2)，不同真菌所产生的有性孢子的类型有所不同。在一种封闭的囊（子囊）产生的有性孢子叫子囊孢子（ascospore）（图 14. 14)；在一种棒形（担子）的末端产生的有性孢子叫担孢子（basidospore）（表 14. 2 和图 14. 32c)。接合菌纲的真菌，如常见的面包霉菌根霉（*Rhizopus*）产生大型的接合孢子，肉眼可见，是菌丝融合和遗传交换的结果。接合孢子（zygospore）最终成熟后产生有性孢子通过空气散播、萌发形成新的真菌菌丝体。

真菌的有性孢子通常对干燥、热、冷冻和某些化学试剂具有抗性。然而，真菌的有性孢子对热的抗性不如细菌的内生孢子（endospore）（见 4. 13 节)。任何一种无性的或有性的孢子均能萌发并且发育成新的菌丝和菌丝体。

许多真菌，特别是担子菌纲（Basidiomycetes）的成员（表 14. 2)，一个重要的生态学活性是可以分解木质、纸、布和其他来自于自然界的产物。侵蚀这些产物的担子菌能够利用它们的纤维素或者木质素作为碳源和能源。木质素（lignin）是一种由含酚化合物构成的复杂高聚物，它是木本植物的重要组分并且与纤维素结合在一起使树木坚硬。在自然界木质素的分解总是专门通过某些被称为木腐真菌（wood-rotting fungi）的担子菌来进行的。已知有两种木腐类型：褐腐（brown rot）优先分解纤维素，剩下的木质素无变化；另一种为白腐（white rot)，纤维素和木质素均被分解。白腐真菌被认为具有生态学意义，因为它们在森林木质材料的分解中起着重要的作用。

大型真菌：蘑菇

蘑菇（mushroom）是丝状的担子菌，形成大的子实体（fruiting body）（蘑菇的可食部分）（图 14. 32a)。我们将在 30. 14 节中讨论蘑菇作为食物资源的商业生长。

蘑菇的大部分时期以一种简单的菌丝体存在，生长在土壤、枯叶或腐木上。然而当

环境条件适宜的时候，通常是湿冷的天气后，发育形成子实体。开始是一个小的菌蕾形结构，存在于地下，接着膨胀形成完全长好的子实体（地上可见部分）（图 14.32a），然后形成有性孢子，称为担孢子（basidiospore）。担孢子长在子实体扁平盘的下层——菌褶（gill）处，贴着菌盖（图 14.32b，d）。蘑菇的担孢子被风吹散，最终着陆于适宜的，通常是湿润的有机物丰富的土壤中，再一次开始上述循环（图 14.32d）。

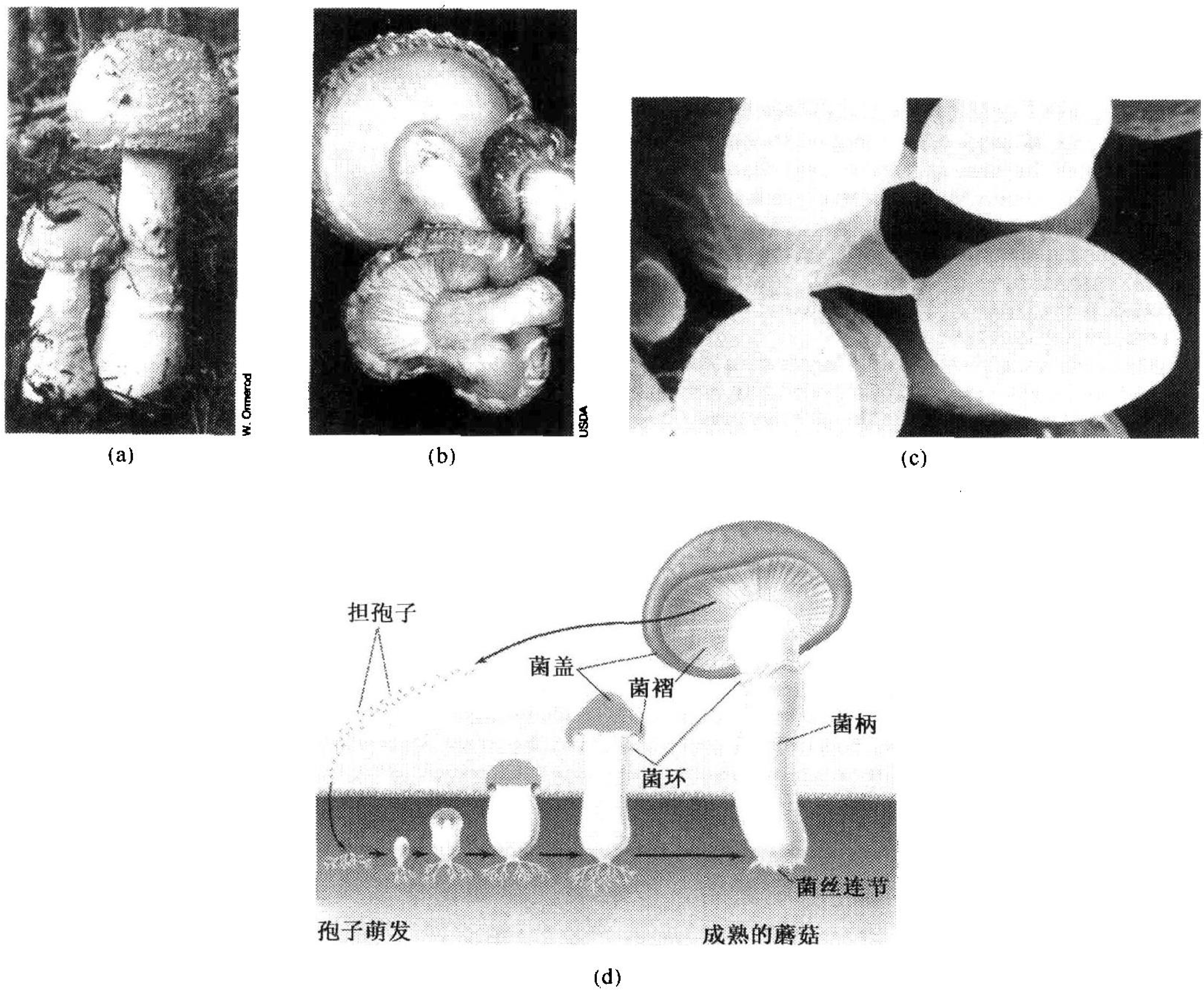


图 14.32　蘑菇。（a）毒伞属（*Amanita*），一种有剧毒的蘑菇。（b）蘑菇子实体下层的菌褶形成产孢子的担子。（c）从蘑菇的担子释放出的担孢子的扫描电镜照片。（d）典型的蘑菇生活史图。作为食物来源的蘑菇的生产将会在 30.14 节中提及。

单细胞真菌：酵母菌

酵母菌（yeast）是单细胞真菌（unicellular fungi），它们的大多数在分类上属于子囊菌纲（Ascomycetes）（表 14.2）。酵母菌细胞通常是球形、卵圆形或者是圆柱形。细胞通常以出芽方式进行分裂（图 14.33）。在出芽过程中，一个新细胞的形成是从老细胞上长出凸起，称为芽，芽渐渐长大，然后脱离母细胞（图 14.33 和图 14.34）。尽管多数酵母菌仅以单个细胞进行繁殖，某些酵母菌也能形成丝状体。在这些种类中，某些特征只有以丝状体的形式才能表现。例如，白假丝酵母（*Candida albicans*）能引起阴道、口腔、肺感染，以及艾滋病患者的系统组织损害，其丝状体对致病性非常关键（见 26.14 节）。

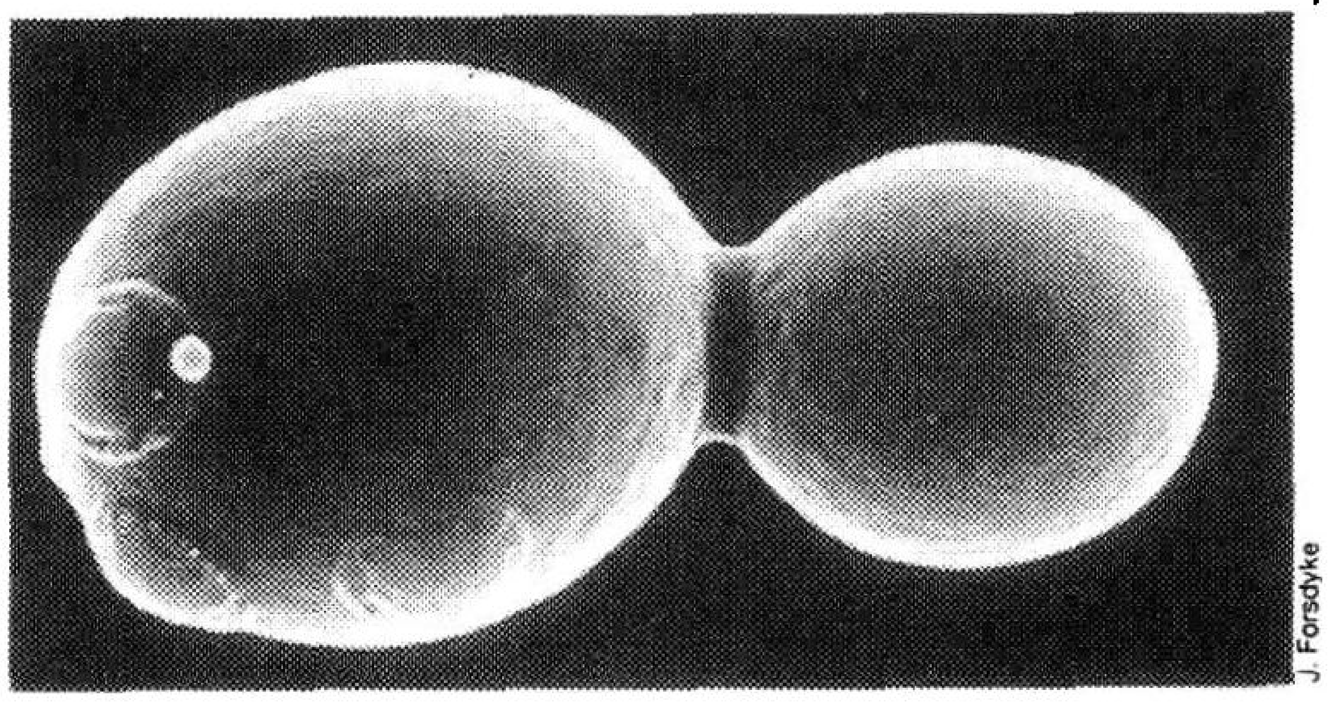


图 14.33 用于面包发酵和酿酒的酿酒酵母（*Saccharomyces cerecisiae*）的扫描电镜照片。注意出芽繁殖和老的芽痕。单个细胞直径约 8μm。

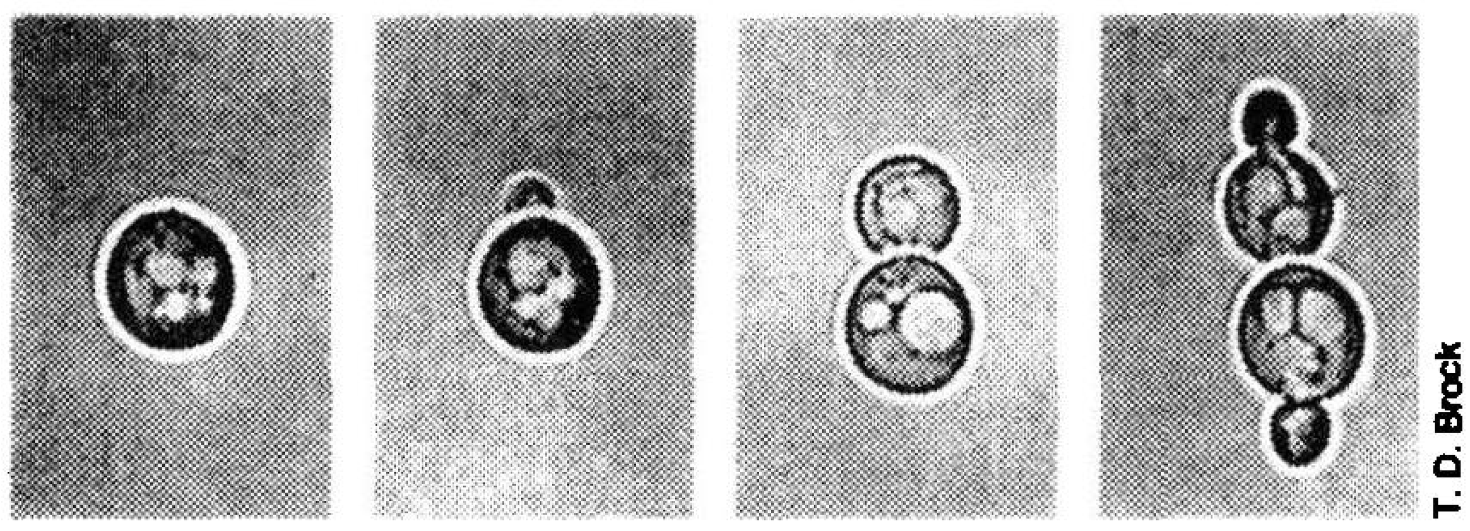


图 14.34 以出芽繁殖进行生长的酿酒酵母（*S. cerecisiae*）。显示了从单个细胞中开始出芽分裂的一系列时间间隔照片。注意显著的细胞核。对照期的显微照片，酿酒酵母单个细胞的直径约 8μm。

酵母细胞通常比细菌细胞要大得多，并且，从其大的个体和内部结构，例如，核的存在（图 14.34），在显微镜下可与细菌加以区别。通过接合（mating）的方式，即两个酵母细胞的融合，某些酵母菌可以进行有性生殖。在称为接合子（zygote）的融合细胞中形成子囊孢子。我们在 14.7 节中曾经讨论过一种典型的酵母菌——酿酒酵母的有性循环，其中包括接合类型（mating type）的重要性质（图 14.14～图 14.6）。

酵母菌通常在有糖的环境中繁衍，像水果、花和树皮。大多数酵母菌是兼性需氧菌，能够进行完全的需氧新陈代谢，也能进行发酵代谢。许多种的酵母菌与动物共生，特别是昆虫，有少数的种是动物和人的致病菌（见 27.7 节）。许多重要的商业用酵母菌是面包酵母和酿酒酵母，它们是酵母属（*Saccharomyces*）的成员（微生物边栏，酵母发酵的产物，第 5 章）。这些酵母菌最初的栖息地毫无疑问是水果和果汁，但是，今天的商业用酵母菌可能与野生种有很大不同，多年来工业微生物学家已通过仔细的筛选和基因操作技术对它们进行了大幅度的改造。酿酒酵母（*S. cerecisiae*）作为模式真核生物已被研究多年（见 14.7 节），是第一个被全基因组测序的真核生物（见 15.6 节）。

概念检查

真菌包括霉菌和酵母菌。真菌不同于原生动物之处在于真菌有坚硬的细胞壁，产孢子，无运动性等特征和进化地位。蘑菇是大型的真菌，通常可食用，产生含有担孢子的子实体。

◆ 如何区分霉菌与酵母菌?

◆ 何谓几丁质(壳多糖),在真菌中它的功能是什么?

◆ 如何区分霉菌的分生孢子与子囊孢子?

14.13 藻类

主要属:衣藻属(*Chlamydomonas*)、眼虫藻属(*Euglena*)、膝沟藻属(*Gonyaulax*)

藻类(algae)是一个大的、多种多样的真核生物的集合类群(图 14.35 和图 14.36)。这个类群包含有叶绿素并且是生氧光合类型(见 17.5 节)。藻类不能与同样也是生氧光合型但属于细菌且在进化上有别于藻类(真核生物)的蓝细菌(*cyanobacteria*)和原绿藻(*prochlorophytes*)相混淆(见 12.25 节和 12.26 节)。大多数藻类是显微大小,显然它们是微生物,而一些种类是多细胞的,肉眼可见。例如,与硅藻亲缘关系相近的大型海藻生长时可超过 100 英尺。

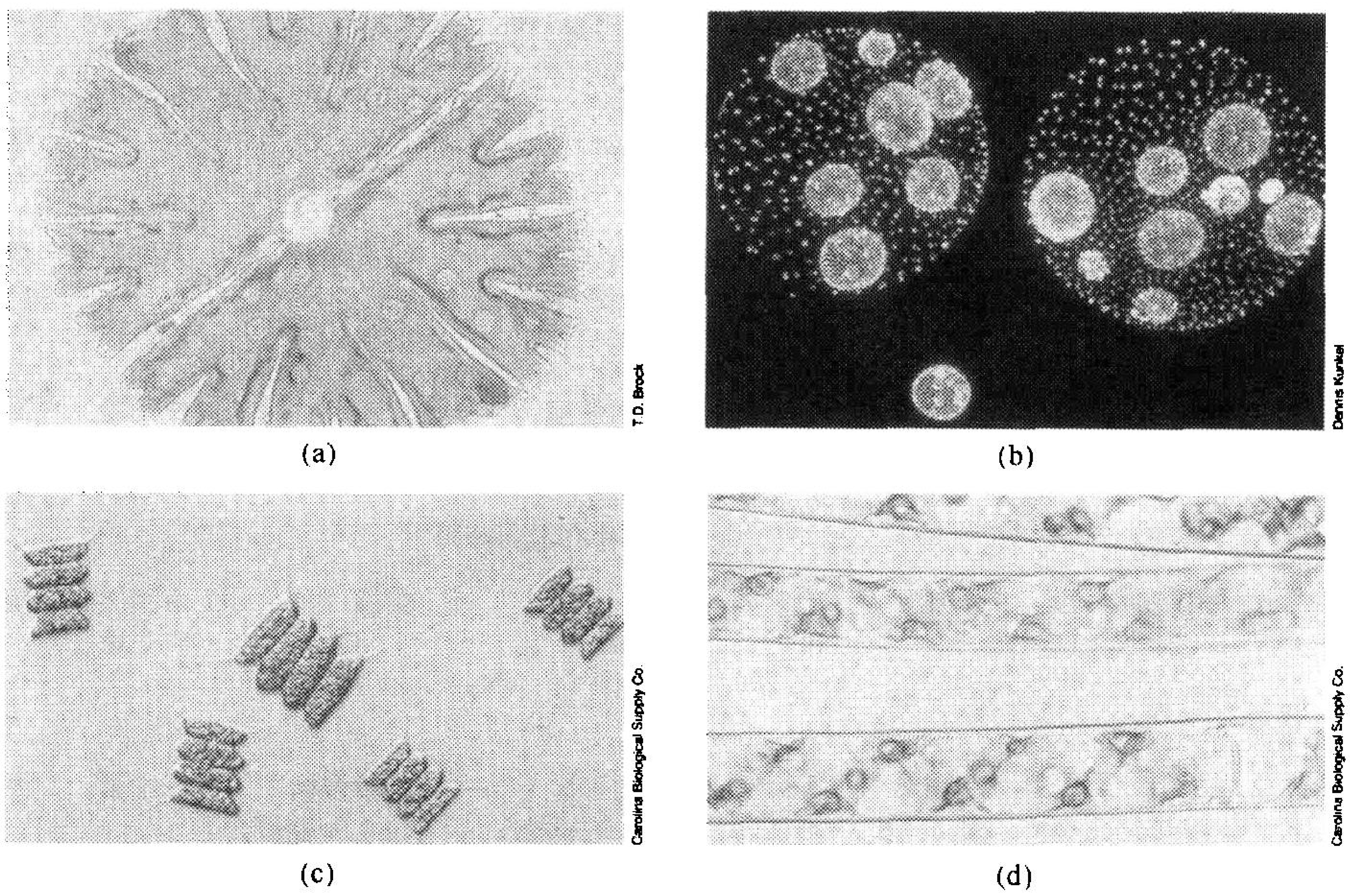


图 14.35　光合微生物有代表性的绿藻。(a)微星鼓藻(*Micrasterias*),一种单细胞藻类。(b)团藻(*Volvox*)集合体,包括许多细胞。(c)栅藻(*Scenedesmus*)由 4 个细胞排列成包囊状。(d)水绵(*Spirogyra*)一种丝状藻类。注意绿色螺旋形叶绿体。

藻类的多样性

大部分藻类是单细胞(unicellular)(图 14.35a、c)或者是群体(colonial)。群体是以“细胞的集合体形式出现”(图 14.35b)。当细胞以头尾连接成集合体时,我们认为它们是丝状(filamentous)(图 14.35d)。丝状有不分枝和错综复杂的分枝两种。

藻类含有叶绿素,呈绿色。然而,少数藻类不是绿色,呈褐色和红色。因为,除叶绿素外,其他色素,如叶黄素和类胡萝卜素的存在,掩盖了绿色。藻类细胞含有一个或

多个叶绿体，在它的膜结构中分布着光合色素（见 14.3 节）。藻类细胞中的叶绿体因其独特的绿色，在显微镜下很容易观察到（图 14.35）。在 14.3 节中我们曾讨论过叶绿体的结构和性质，在 12.27 节和 14.4 节中讨论过叶绿体的进化。

观察图 14.20 可以看出，藻类是一个系统发育异源的类群。以 18S rRNA 序列为标准来判断，虽然绿藻（Chlorophyta；表 14.3）和较小范围的红藻（Rhodophyta；表 14.3）与绿色植物有非常密切的关系，但其他藻类的类群，如褐藻和硅藻则更为古老（图 14.20a）。眼虫状的藻类更为古老，像眼虫藻（*Euglena*）（图 14.36a）。眼虫状的藻类与具鞭毛的原生动物（锥体虫）在所有的进化树中，显示出一种系统发育的亲缘关系（图 14.20）。眼虫藻细胞能自发地失去它们的叶绿体而完全成为一种异养生物（见 14.10 节），也就不为怪了。值得注意的是红藻（图 14.36b）的叶绿体缺乏类胡萝卜素 b 而含有藻胆色素蛋白（phycobiliprotein）——蓝细菌的主要光吸收色素（见 17.3 节）。相反，绿藻的叶绿体缺乏藻胆色素（phycobilin）而含有叶绿素 a 和 b。

表 14.3 主要藻类类群的特征

藻类类群	名称	形态	色素	代表种	可储藏的碳源物质	细胞壁	主要栖息地
绿藻门（Chlorophyta）	绿藻（Green algae）	单细胞到多叶状	叶绿素 a 和 b	衣藻（*Chlamydomonas*）	淀粉（α-1,4-葡聚糖）、蔗糖	纤维素	淡水、土壤、少数海洋
眼虫藻门[a]（Euglenophyta）	眼虫藻类（Euglenoids）	具鞭毛的单细胞	叶绿素 a 和 b	眼虫（*Euglena*）（见图 14.36a）	裸藻淀粉（β-1,2-葡聚糖）	无细胞壁	淡水、少数海洋
腰鞭毛藻门（Dinoflagellata）	腰鞭毛虫（Dinoflagellates）	具鞭毛的单细胞	叶绿素 a 和 c、叶黄素	膝沟藻属（*Gonyaulax*）；*Pfiesteria*（一种有毒赤藻）	淀粉（α-1,4-葡聚糖）	纤维素	多数海洋
金藻门（Chrysophyta）	金褐藻（Golden-brown algae）、硅藻（diatoms）	单细胞	叶绿素 a 和 c	菱形藻属（*Nitzschia*）（见图 14.36b）	类脂	由两片硅质壳盖合	淡水、海水、土壤
褐藻门（Phaeophyta）	褐藻（Brown algae）	丝状体到多叶状，偶有块状	叶绿素 a 和 c、叶黄素	海带（*Laminaria*）	昆布多糖（β-1,3-葡聚糖）、甘露醇	纤维素	海洋
红藻门（Rhodophyta）	红藻（Red algae）	单细胞，丝状到多叶状	叶绿素 a 和 d、藻胆蛋白、藻红蛋白	多管藻属（*Polysiphonia*）（见图 14.36b）	红藻淀粉（α-1,4-和 α-1,6-葡聚糖）	纤维素	海洋

a. 这一类群也被认为是原生动物（见 14.10 节）。

腰鞭毛虫（Dinoflagellate）是有鞭毛的早期海洋藻类，它们与原生动物的一些类群进化关系比较相近（图 14.20）。有些腰鞭毛虫是自由活动的（图 14.36f），而有些则与动物共生存在，以形成珊瑚礁，具有一个壳状的保护性的栖息地，同时作为交换，提供光合固定的碳给珊瑚礁当作食物。

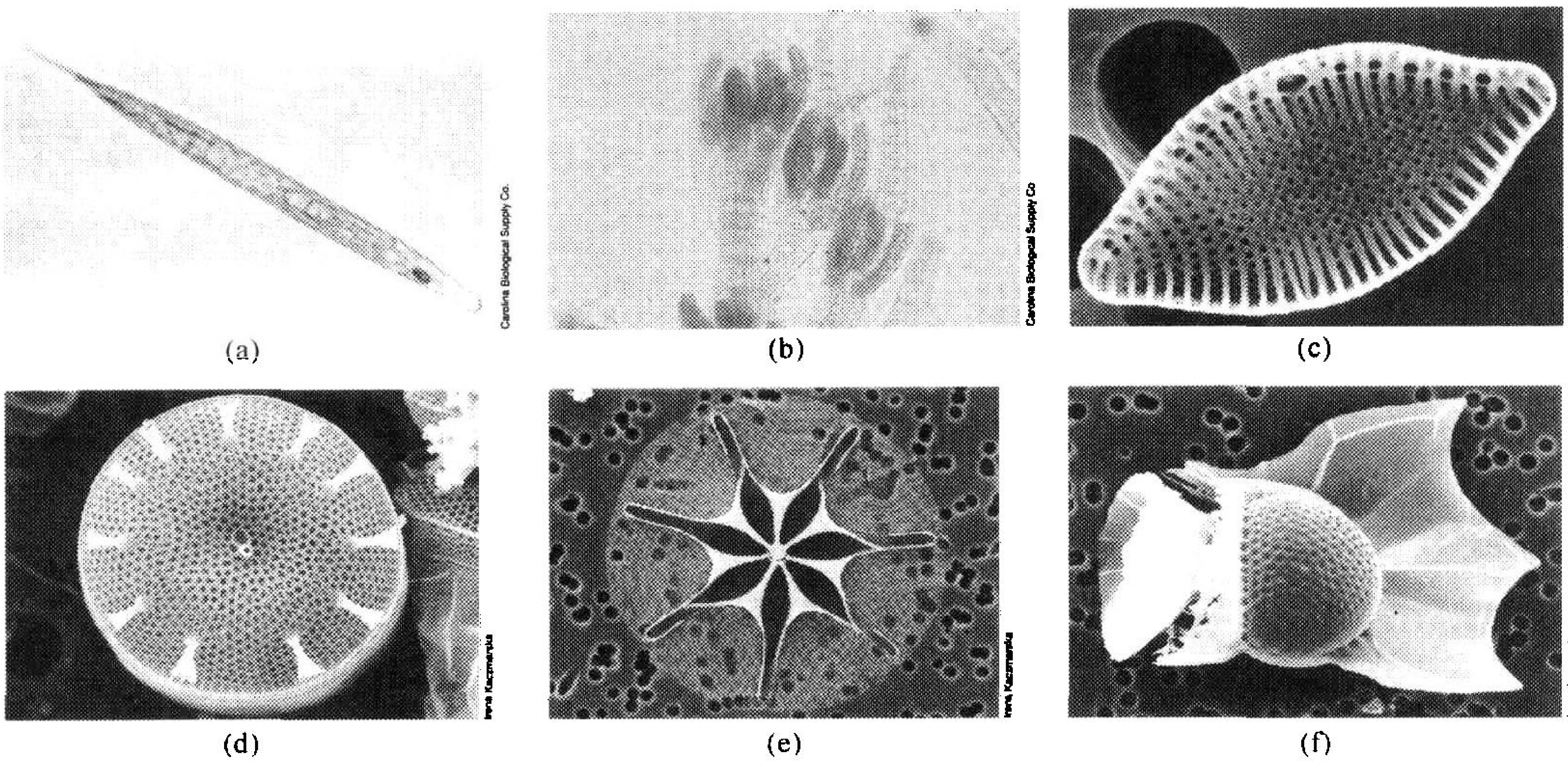


图 14.36　与绿藻（绿藻门，Chlorophyta）不同的藻类。（a、b）光学显微照片。（a）眼虫（*Euglena*），眼虫藻门（Euglenophyta）的一种（细胞约 15μm 宽），这类生物比绿藻要原始得多（图 14.20），并且和具鞭毛的原生动物有着共同的特征。（b）多管藻属（*Polysiphonia*），一种海洋红藻（红藻门，Rhodophyta），附着生长在各种海洋植物表面（细胞大约 150μm 宽）；（c～f）扫描电镜显微图。（c～e）硅藻壳，一种硅质围墙或壁，适当地围绕着硅藻细胞。（c）海洋硅藻菱形藻属（*Nitzschia*）的壳，呈羽纹对称（细胞约 10μm 宽）。（d）海洋硅藻海链藻属（*Thalassiosira*）的壳，呈辐射对称（细胞直径约 5μm）。（e）海洋硅藻（*Asteriolampra*）的壳，呈辐射对称（细胞约 5μm 宽）。（f）海洋大鸟尾藻（*Ornithocercus magnificus*），细胞具圆球状的中心结构；附着的华丽构造被称为边翅（细胞约 30μm 宽）。

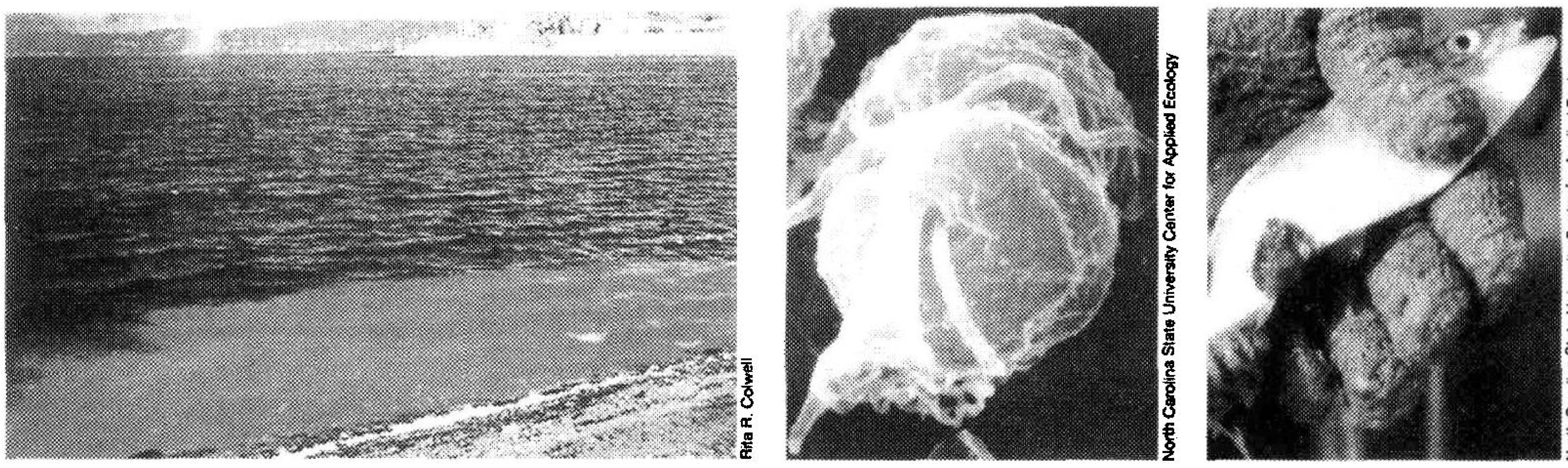
毒性的腰鞭毛虫

腰鞭毛虫如膝沟藻属（*Gonyaulax*），有时长成浓密的悬浮状，称作“藻华”（bloom），由于叶黄素在其体内以附属的色素存在，而呈明亮的红色。这种“藻华”是典型的“红潮”（图 14.37a），偶尔发生在温暖的，通常是被污染的海岸水域。经常伴随着鱼的死亡，人食用了污染的水或贝壳类的虾后中毒（见 28.4 节）。毒性发生是因为一种由膝沟藻属产生的潜在的神经毒素，在纳克级水平就足以毒杀死鱼类。

Pfiesteria 为一种有毒的赤藻，属于毒性腰鞭毛虫的另一个属。有毒赤藻 *Pfiesteria piscicida*（图 14.37b）的毒性孢子感染鱼类并最终通过神经毒素影响运动和毁坏皮肤而杀死它们。鱼的皮肤被损伤后，使得条件致病菌能够生长（图 14.37c）。*P. piscicida* 能够导致大规模的鱼死亡（图 14.37c）。例如，在 1991 年，在美国的北卡罗来纳州（Carolina）的 Nuese Estuary，暴发的 *P. piscicida* 杀死的鱼多达十亿条以上。此外沿美国的东海岸也有 *P. piscicida* 的暴发。由 *P. piscicida* 中毒造成的人毒血症也有发生，但其相关性不像在鱼类中那样紧密。

色素、能量代谢和储藏的高聚物

包括叶绿素的种类、所产生的用来储藏碳的高聚物（如淀粉和几种淀粉的衍生物）、细胞壁结构以及运动方式在内的各种特征均可用于藻类的分类。所有的藻类都含有叶绿



(a) (b) (c)

图 14.37 有毒的腰鞭毛虫（dinoflagellates）。（a）产毒素的腰鞭毛虫，如膝沟藻属（*Gonyaulax*），大量生长形成的“赤潮”照片。毒素被分泌到水中，在扑食了腰鞭毛虫的贝壳类体内聚集。这类毒素对贝类没有毒害作用，但能毒害吃了被感染的贝类的鱼和人类。（b、c）有毒的 *Pfiesteria*。(d) *Pfiesteria piscicida* 有毒孢子的电镜扫描图。(c) 被 *P. piscicida* 毒死的鱼，注意肌肉腐烂的损害。

素 a，然而，某些种类会含有其他的叶绿素，这些叶绿素与叶绿素 a 存在一些小的差别。这些附属的叶绿素是特殊藻类类群的特征。叶绿素及其他光合色素在藻类中的分布列在表 14.3 中。

所有的藻类都进行生氧光合作用，并使用 H_2O 作为电子供体。另外，有些藻类可以在不产氧的情况下利用 H_2 作为电子供体进行光合作用。许多藻类是专性光合营养，因此不能在黑暗中以有机碳化合物为营养进行生长。但是，有些藻类可以行化能有机生长，并在黑暗中合成简单糖类与有机酸。藻类利用最广泛的有机物之一是乙酸。许多鞭毛藻和绿藻均可以将其作为唯一的碳源和能源。除此之外，有些藻类可以在有光时同化简单的有机物（光能异养，图 17.1 和 17.4 节）但在黑暗中确不能利用它们进行生长。

用于藻类分类的关键特征之一是光合合成产物：储备高聚物（reserve polymer）的性质。绿藻门的藻类产生淀粉（α-1，4-葡聚糖）的方式与高等植物非常类似。相反的是，其他类群的藻类产生多种储存物质，有些是聚合物，有些是自由的单体；其主要类型列于表 14.3 中。

藻类的细胞壁

藻类细胞壁的结构和生物化学呈现出相当大的多样性。在许多情况下，藻类的细胞壁是由纤维素的微纤丝形成的网状结构构成。但是，藻类的细胞壁通常增添了其他的多糖如果胶、木糖、甘露糖、藻酸或地衣酸。在某些藻类中由于碳酸钙的沉积，细胞壁变得坚硬，这样的藻类经常被称为石灰质的、钙质（calcareous）的或者珊瑚状（coralline）的藻。有时几丁质（一种 *N*-乙酰氨基葡萄糖的高聚物，图 3.5），也存在于藻类的细胞壁中。眼虫藻类没有细胞壁（图 14.36b）。

在硅藻中（图 14.36c～e），其细胞壁是由二氧化硅（silica）构成的，其内含有蛋白质和多糖，即使硅藻死亡之后有机物被分解，被称为硅藻壳（frustule）的外部结构仍保留着，这说明硅质化合物确实担负着细胞的硬化作用。由于这些硅藻的硅酸盐壳能抵抗腐烂，所以它能够长期完整地保存下来，形成最好的藻类化石。这种出色的化石记

载使我们得知，大约在 20 亿年前，硅藻已经在地球上出现。硅藻壳的形态通常呈现出某种对称形式。例如，羽纹（pennate）对称，轴的两侧完全相对排列（图 14.36c）和辐射（radial）对称（图 14.36d、e）。

藻类的细胞壁含有 3～5nm 宽的小孔，这种小孔可以允许低分子质量的物质通过，如水、无机离子、气体和其他新陈代谢和生长所需的小分子营养物质。在藻类中是不可能发生吞噬作用的，在这一点看来，藻类与具有吞噬能力的原生动物和黏菌是不同的。

藻类的运动性

通常因为藻类有鞭毛（图 14.10），许多藻类能运动，但就如人们所知道的，藻类没有纤毛。具鞭毛的藻类，如眼虫（图 14.36a），具有单极生鞭毛，而绿藻门的鞭毛特征是具有 2～4 根极生鞭毛。腰鞭毛虫（dinoflagellates；图 14.36f 和图 14.37）有两根不同长度并以不同位点（横向和侧向）插入的细胞内的鞭毛，横向的鞭毛附在侧面，纵向的鞭毛源于细胞侧面的凹槽，并向纵向延长（图 14.37b）。在许多情况下，藻类处于营养状态时并不运动，只形成可运动的配子。少数的藻类，如硅藻也能通过滑行（gliding motility）来运动，这种运动方式在丝状的蓝细菌和多种原生动物中很普遍。

藻类生态学和岩石内藻类群落

藻类生长在淡水和海水水域中，同样也出现在或人工的水域中，如鱼池（或养鱼箱）、游泳池和暴露在阳光下的因雨水蓄积而形成的临时水池。藻类通常栖息在潮湿的土壤中，少数的种类也能在干燥或者含水很低的极端干燥的地方生长（见 6.14 节）。藻类通常也是极端酸性栖息地的优势类群或者是唯一的光合微生物；低于 pH4 时，蓝细菌不能生长，因此生氧光合作用（oxygenic photosynthesis）仅在藻类和少数耐酸的植物中发生。例如，红藻（*Cyanidium*）能在低于 pH2 的环境下生长。

有些藻类能在岩石中生长，这些岩石内的（endolithic，endo 的意思是"在……里面"）光合有机体栖息在岩石的孔中。例如，那些含有石英，并在表面常有分层的岩石。岩石内的光合营养型群落在干燥的环境中是很常见的，如沙漠或像南极那样的冰冷、干燥的环境（图 14.38）。例如，在南极的干谷（Antarctic Dry Valleys），温度和湿度非

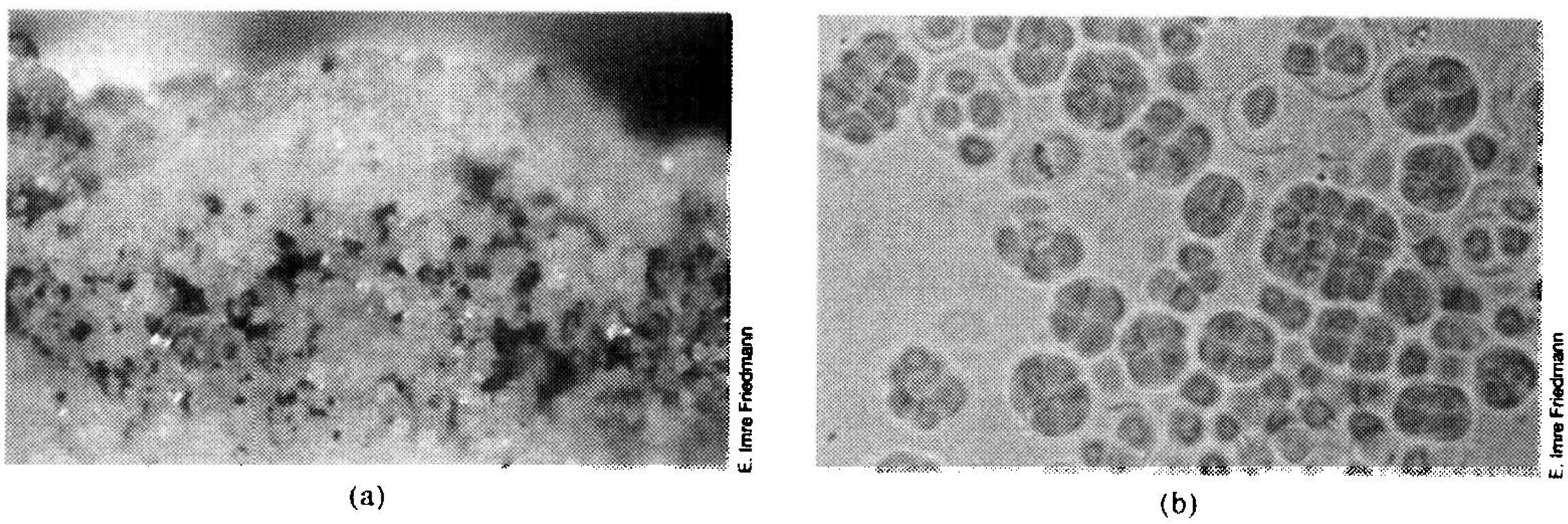


图 14.38　岩石内的蓝细菌（cyanbacteria）。（a）来自以色列 Negev 沙漠 Makhtesh Gadol 的石灰岩照片，显示蓝细菌拟色球蓝细菌属（*Chroococcidiopsis*）的一层细胞。（b）分离自 Negev 沙漠砂岩的拟色球蓝细菌属细胞的显微照片。

常低，在岩石中的生命有着其优势。岩石被太阳照热，雪融化后的水可以被岩石吸收并保留相当长的时间，提生长供所需的湿度，而且水被多孔的岩石吸收后使得岩石变得更透明，因此可透射更多的光到藻类的层面。

多种光合生物能形成岩石内生长的群落，包括蓝细菌（图 14.38b）和各种绿藻。除了进行自由的光合作用，绿藻和蓝细菌与岩石中的真菌地衣共生（19.20 节讨论了地衣的共生）。这些岩石内群落的新陈代谢和生长慢慢风化着岩石，形成裂缝，使得水可以进入其中，冰冻、融化，最终使岩石破裂，产生新的栖息地供微生物定植（microbial colonization）。

概念检查

藻类是能进行光合作用的真核微生物，其叶绿体含有叶绿素和类胡萝卜素。叶绿体在细菌域有其自身的根基。

- ◆ 如何区分藻类和蓝细菌？
- ◆ 红藻有何不同寻常之处？
- ◆ 藻类的主要栖息地在哪里？

复习题

1. 列出真核细胞与原核细胞特征的区别（至少 3 处）。（见 4.1 节～4.5 节）
2. 线粒体和氢化酶体有哪些相似的结构？又有何不同？它们的新陈代谢有何不同？（见 14.2 节）
3. 在叶绿体中发生的主要生理过程（与能量相关的和与碳相关的）有哪些？（见 14.3 节）
4. 从链霉素阻断器官中蛋白质的合成，我们可以得知抗生素与细菌是怎样一种关系？（见 14.4 节）
5. 微丝和微管的化学成分差异是什么？这类结构在原核细胞中真的不存在吗？（在回答问题前请查阅 6.2 节）（见 14.5 节）
6. 阐述以下真核细胞结构的功能：内质网、高尔基复合体、溶酶体、过氧化物酶体。（见 14.5 节）
7. 对比原核生物和真核生物中鞭毛的运动。（见 14.4 节和 14.5 节）
8. 讨论在缺乏端粒酶活性时，基因最终是如何从真核生物的 DNA 中丢失的？（见 14.6 节）
9. 对照比较有丝分裂和减数分裂的过程。哪一过程对酿酒酵母的生长是绝对必需的？为什么？酵母细胞的分型是如何确定的？（见 14.7 节）
10. 为什么真核生物的 mRNA 要被“加工”，而大部分原核生物的 RNA 不需要这一过程？（见 14.8 节）
11. 真核微生物的系统发育还没确定，讨论图 14.20 中显示的两种系统发育进化树的主要区别。（见 14.9 节）

12. 原生动物主要类群的名称有哪些？（见 14.10 节）
13. 绒泡菌属和网柄菌属生物体的主要区别是什么？（见 14.11 节）
14. 对照比较原生动物、真菌和藻类，列出你区别这 3 类生物体的方法（两种以上）。这 3 类中的哪一类与黏菌最为相似，为什么？（见 14.12 节和 14.13 节）
15. 用什么方法区分不同的藻类？（见 14.13 节）
16. 什么是硅藻壳，由哪一种藻类产生？（见 14.13 节）

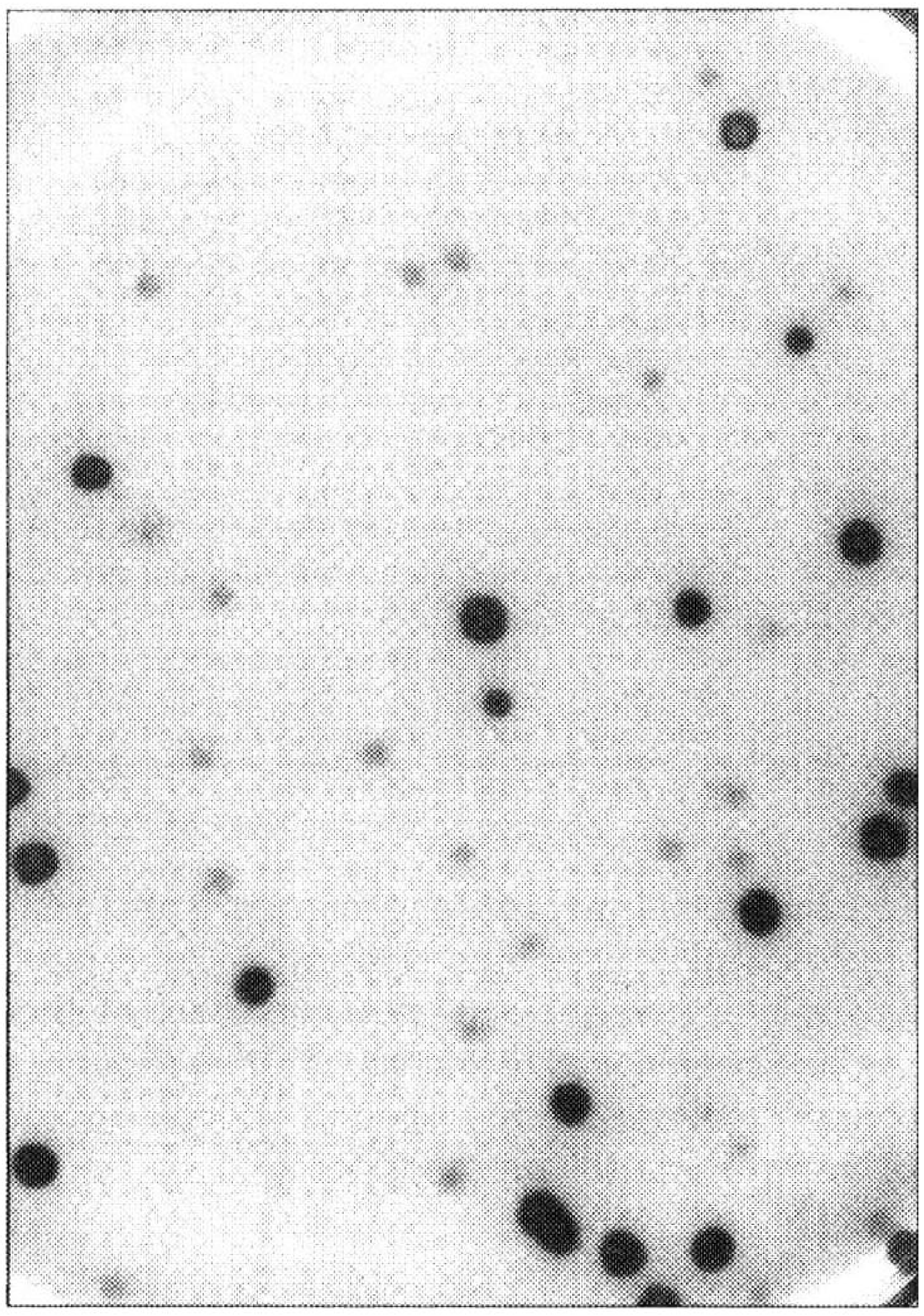
应用题

1. 如果细胞器如线粒体和叶绿体最初源于自由生活的真核细胞，在 14.4 节列出的细胞器的分子特性会有何不同？
2. 在下一章你们会学习真核细胞，一般来说，真核细胞的基因组要比原核细胞大，列出 3 个原因分析为何会这样？

（严　冰　译，杨文博　校）

15

微生物基因组学



基因组测序揭示了一种生物遗传信息的蓝图。任何一个基因组计划都是起始于将全基因组克隆成大小可操作的片段，如将片段克隆到在这里显示的细菌噬菌体里。这里的白斑表示，细胞中含有内部插入了 DNA 片段的噬菌体 M13，它可以在大肠杆菌中进行复制。

词汇表

注释（annotation）：将生物体内原始的核苷酸序列转变成一系列的基因（基因的定位）

人工染色体（artificial chromosome）：一个用于克隆的载体，它能够携带非常大的外源 DNA 片段，它存在于细胞内，非常像细胞内染色体。应用最广的有细菌人工染色体（BAC）和酵母人工染色体（YAC）

生物信息学（bioinformatics）：运用计算机工具去采撷、分析、存储和查询 DNA 序列和蛋白质序列

基因家族（gene family）：生物体内，一些基因与另外一些基因在序列上相似

基因组（genome）：细胞或病毒内全部的基因

基因组学（genomics）：包括绘制、测序、分析和比较基因组的学科

同源基因（homologue）：一个基因与另外一个或其他的多个基因拥有共同的进化祖先

水平基因转移（horizontal gene transfer）：一种生物体内的一个基因来源于另外一种生物，是通过遗传交换进行了转移

可读框（open reading frame，ORF）：一段 DNA 序列不含有框内终止密码子，如果被转录，可以被翻译成一个已知长度和氨基酸组成的蛋白质。功能 ORF 是指在细胞内真正编码一个蛋白质的可读框

直向同源基因（ortholog）：在一种生物内发现一个基因与另外一种生物的基因相似，但物种不同（见"种内同源基因"）

种内同源基因（paralog）：一种生物内的一个基因与同一种生物内的另外一个或多个基因相似，是基因复制的结果（见"直向同源基因"）

蛋白质组（proteome）：任一时期内存在于细胞、组织和生物内部的所有的蛋白质

蛋白质组学（proteomics）：大规模或基因组范围地研究一种生物体内蛋白质的结构、功能和调控

RNA 编辑（RNA editing）：不同于 RNA 剪接，它是通过对编码蛋白质的基因所产生的转录本进行修饰，获得所需要的编码特性

鸟枪法测序（shotgun sequencing）：对基因组随机产生的小片段进行克隆、序列测定，并通过计算的方法，重建整个基因组序列

转录物组（transcriptome）：在特定的条件下，一种生物所产生的所有的 mRNA

一种生物的基因组（genome）是指它所包含的所有基因。基因组的序列揭示的不仅仅是基因信息，而且能够为研究生物如何活动及它们的进化历史提供重要的线索。基因组的序列信息同时也有助于研究整个基因组中基因表达（gene expression）、转录和翻译。传统的研究基因表达的方法是集中研究一个基因或者是一组相关基因。现今，一个生物中所有的基因的表达情况可以仅仅通过一个实验进行检测。基因组学（genomics）是涉及基因组的绘制、测序、分析和比较的学科。该章主要集中讲述微生物的基因组学。

1976 年，首次进行了 MS2 病毒（virus）RNA 基因组的序列测定（长 3569nt）（见 16.1 节）。1977 年，首次进行了单链 DNA 病毒 ϕX174 基因组的序列测定（长 5386nt）（见 16.2 节），这项研究工作是由 Frederick Sanger 领导的研究组完成，Sanger 首次将双脱氧核苷酸技术运用在测序工作中（见 7.8 节）。1995 年由 Hamilton O. Smith、J. Craig Venter 和他们所在的基因组研究所——TIGR（Rockville，MD，USA）的同事

们首次测定了在细胞水平上嗜血流感病毒（*Haemophilus influenza*）的长 1 830 137bp 的染色体的序列。在 2000 年的春天，一项基因组测序计划启动，目的是完成人的单倍体基因组（约 30 亿碱基）的序列测定。目前，几百种生物的基因组序列测定已经完成，许多其他生物基因组的测序工作正在进行中。我们正处在基因组的时代。这个领域的研究成果将使我们能够更多地关注有关临床医学和微生物进化的研究课题。

如果没有相关的技术上的进步，就不可能完成庞大而复杂的基因组序列测定和分析的工作。在测序技术中，主要的进步是 DNA 测序的自动化（见 7.8 节）。另一个进步就是：一种强有力的分析、储存、处理 DNA 和蛋白质序列计算方法的发展，这个领域被称为生物信息学（bioinformatics）。然而，还有一个主要的技术进步是大 DNA 片段的克隆。

在本章中，我们将着重讨论一些模式微生物的基因组，一些用来分析这些基因组的技术，以及微生物基因组给我们提供了怎样的信息。我们从克隆开始讲述，因为这一步的成功是基因组计划在真正开始前所必需的。

Ⅰ 基因组克隆技术

在本章中，我们将讨论的大部分技术是在第 10 章中所提到的体外（*in vitro*）技术的修改和扩展。这些体外技术的原理是类似的，但现在的重点是研究一种生物的整个基因组而不是一个基因或是一组基因。

15.1 基因组克隆和测序的载体

在前面的章节中，我们已经看到一些被用于分子克隆的质粒和病毒载体（见 10.15 节～10.17 节）。例如，来源于细菌噬菌体 λ 的 pBR322 和 Charon（卡隆），它们已经被广泛地应用于克隆和测序中，包括基因组分析中。此外，许多特殊的载体，包括细菌噬菌体 M13 和细菌、酵母的人工染色体，在这里我们重点进行讲述。

来源于细菌噬菌体 M13 的载体

M13 是一种复制时不会杀死宿主细胞的丝状噬菌体（见 16.3 节）。成熟的 M13 噬菌体颗粒会通过出芽方式而不是裂解方式从宿主细胞释放出来，被感染的细胞培养液能持续地释放噬菌体 DNA。M13 噬菌体基因组包含的大部分基因是病毒复制所必需的，然而有一小段被称为基因间的序列（intergenic sequence）可以被用作克隆位点区。不同长度的外源 DNA 片段，大到 5kb，都可以克隆到这个区域而不影响噬菌体的生存。随着基因组增大，病毒粒子增长。

噬菌体 M13mp18 来源于 M13，其基因间的区域被修饰成为易于进行克隆的位点（图 15.1a）。一个有用的修饰是在其基因组内插入了功能片段 *lacZ* 基因——一个来自于大肠杆菌的编码 β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）的基因。被感染了 M13mp18 噬菌体的细胞可以通过它们在诱导培养基上显示的颜色很容易被检测出来（β-半乳糖苷酶除了能将乳糖分解成为葡萄糖和半乳糖外，还能分解一种复合物产生蓝色产物，图 15.1b）。

lacZ 基因内部包含有一段 54bp 的 DNA 片段，被称为多聚连接物（poly-linker）。多聚连接物中含有几个在 M13 基因组内没有的限制酶酶切位点，因此可以被用作克隆位点。多聚连接物被插入到 *lacZ* 基因编码区的起始部位，因此不会影响酶的活性。然而，当外源 DNA 片段在克隆过程中，插入到多聚连接物中时，*lacZ* 基因失活。有外源 DNA 片段插入的噬菌体会产生无色的菌落（β-半乳糖苷酶无活性），因此可以非常容易地得到克隆（图 15. 1b、c）。已经用相似的策略构建了 λ 的克隆载体和质粒的克隆载体去挑选含有外源片段的菌斑或克隆。

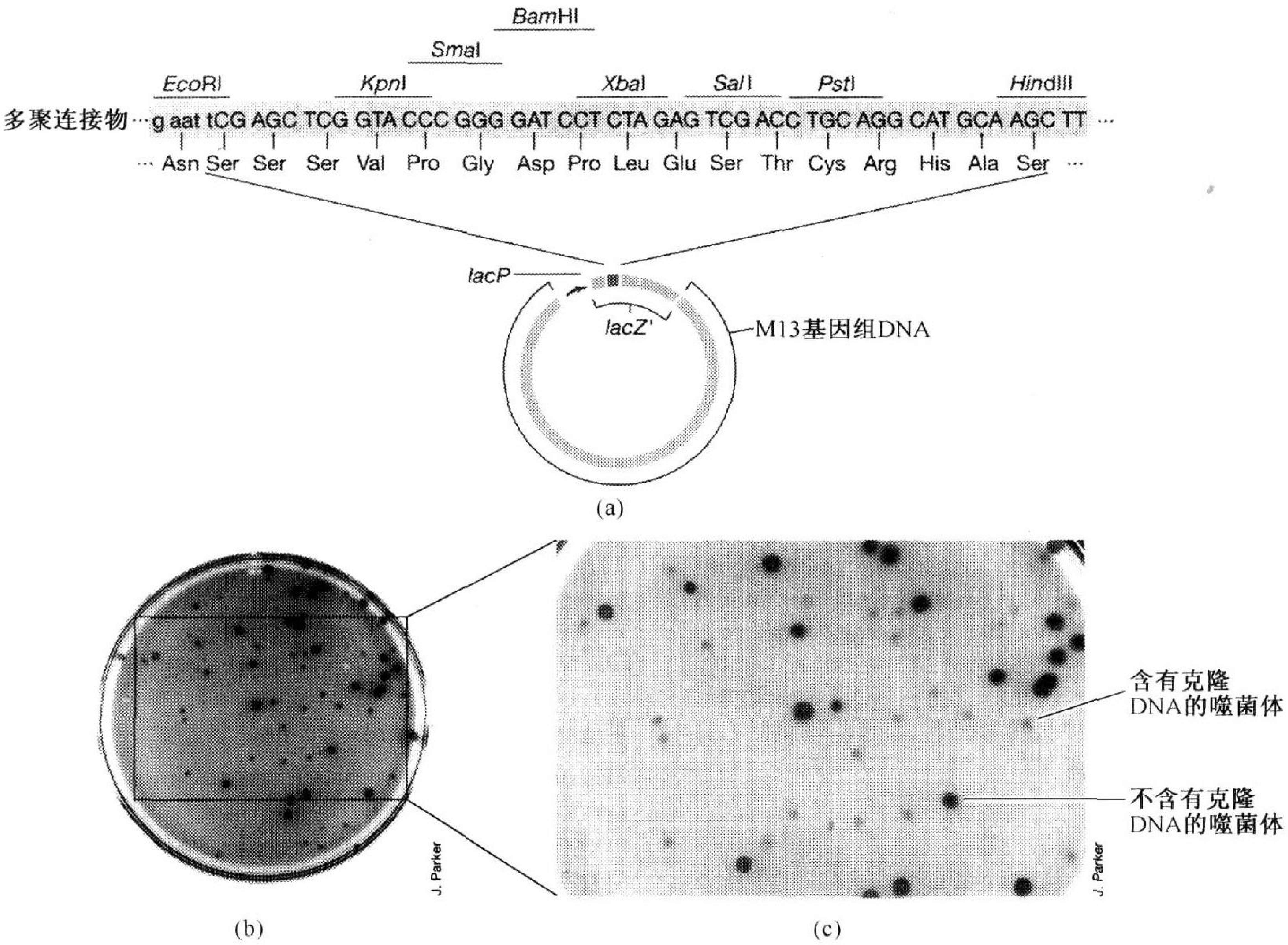


图 15. 1　用噬菌体 M13 进行克隆。（a）M13mp18 的部分图示，构建 M13 载体的衍生物用于克隆。载体中含有 *lac* 启动子（*lacP*）和编码 β-半乳糖苷酶基因功能区的 *lacZ'* 基因。在这个基因的起始部位，有一个含有几个限制酶酶切位点的多聚连接物，但基因仍然保持着正确的可读框。编码多聚连接物的氨基酸序列如图所示。大多数克隆到多聚连接物中的外源 DNA 片段会破坏 *lacZ'* 基因而使转化子不具有 β-半乳糖苷酶的活性。（b）将转化了 M13mp18 的大肠杆菌平铺在含有化合物 5-溴-4-氯-3-吲哚 β-D 半乳糖苷（X-gal）的平板上，它会产生可溶性的蓝颜色。这个平板上的许多菌落是蓝色的，显示这些菌落中，克隆载体中没有外源 DNA 的存在。而许多菌落是无色的，意味着外源 DNA 已经插入到载体中，*lacZ'* 基因已经被破坏。在遗传学技术中，用细菌噬菌体 M13 进行克隆包括挑选和筛选。用蓝白斑颜色的区别，可以挑选出含有外源 DNA 的噬菌体。然而，除非是克隆 PCR 产物，否则必须筛选白斑去找到含有目的基因的克隆。（c）平板中被放大的部分。

用 M13 进行分子克隆

如果要将 DNA 克隆到 M13 载体中，首先从感染的宿主细胞中分离得到可复制的双链 DNA，用一种限制酶进行酶切。外源 DNA 用相同的酶进行酶切。连接后，获得含有外源 DNA 的双链 DNA 分子。当这些分子通过转化进入细胞后（见 10.7 节），它们能够复制，产生含有外源 DNA 的单链 DNA 细菌噬菌体颗粒。

这些产生的单链 M13 DNA 可以直接进行测序。因为外源 DNA 插入区域的碱基序列是已知的（根据所用的限制酶识别序列的特异性）。可以根据已知序列合成一段与这个区域互补的引物，利用 Sanger 测序法测定下游的全部 DNA 的序列。用这种方法，M13 衍生出的系列载体在进行外源 DNA 的测序上就显得尤为重要，甚至是测定更长的 DNA 分子，并且在几种生物的基因组的测序中起到了至关重要的作用。

M13 载体和一些质粒载体能够携带 2kb 的克隆 DNA 片段，这在原核生物基因组测序时，用来制备基因组文库（gene library）是足够的（见 10.15 节）。噬菌体 λ 载体可以携带 20kb 或更大的 DNA 片段，它被广泛地应用于基因组测序。然而随着测序的基因组的扩大，足够多的克隆是否能获得完整的基因组序列呢？因此，制备真核生物和高等真核生物的基因组文库，如人的，能够携带更大的外源 DNA 片段的载体是必需的。这可以保证起始基因组文库的大小是可以控制的。现在已经开发了这样的载体，被称为人工染色体。

细菌人工染色体：BAC

许多细菌在细胞内含有可以稳定复制的大的质粒，如大肠杆菌的 F 质粒（F plasmid)(见 7.4 节和 10.15 节)。F 质粒可以在大肠杆菌中稳定复制，它是由自然存在的 F′ 质粒衍生而来，可以携带非常大的染色体 DNA 片段（见 10.12 节)。基于这些特性，F 质粒被用来构建细菌人工染色体（bacterial artificial chromosome，BAC)。

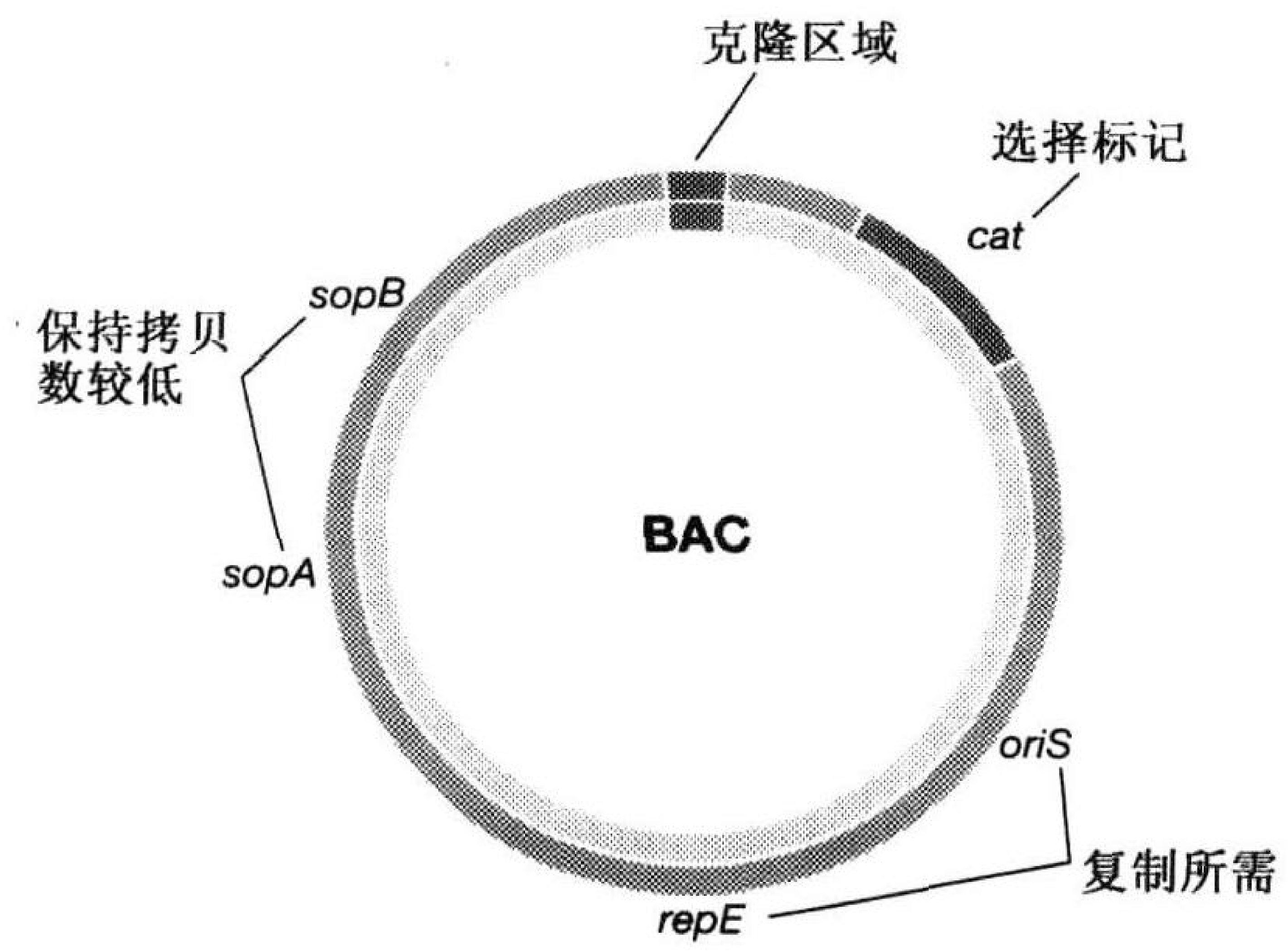


图 15.2 细菌人工染色体的遗传学图谱。BAC 是大肠杆菌 F′质粒的衍生物。BAC 大小 6.7kb。在图谱的顶端有一个克隆区域，包含有几个限制酶识别位点。*cat* 基因，会使宿主细胞带有氯霉素抗性。图中显示了一些与质粒复制有关的基因。在 99.2kb 的 F′质粒上（见 10.18 节)，所有的这些基因位于比较集中的复制区内。因此，BAC 只包含整个 F′质粒的一小段区域。

图 15.2 显示的是根据 F 质粒绘制的 BAC 的结构。载体与 F 质粒 99.2kb 相比，只有 6.7kb 大小。BAC 只含有几个来自于 F 质粒的基因，包括 *oriS* 和 *repE* 基因，这些基因对质粒的复制是必需的，*sopA* 和 *sopB* 基因，可以使质粒保持非常低的拷贝数（见 10.9 节)。在质粒中插入了 *cat* 基因，它会使宿主细胞带有氯霉素抗性，质粒中还有一段包含有几个限制酶识别位点的克隆区域被用于克隆外源 DNA。300kb 的外源

DNA 可以插入并且稳定存在于 BAC 载体中。BAC 的宿主是个典型的大肠杆菌的突变株，缺失了野生型的限制酶修饰系统（见 7.7 节和 9.6 节），这可以阻止 BAC 的降解。宿主细胞一般在重组途径上是缺陷的（见 10.6 节），这会阻止 BAC 上克隆的 DNA 重组到宿主细胞的染色体上。

酵母人工染色体：YAC

前已述及，“人工染色体”（artificial chromosome）一词并非来自 BAC，而是来源于酵母人工染色体或 YAC（yeast artificial chromosome）。在酵母中这些载体能像正常的染色体一样复制，但是它们有大的外源 DNA 片段的插入位点。如果要像真核细胞染色体一样行使功能，YAC 必须具有：①一个 DNA 的复制起点（an origin of DNA replication）；②DNA 能在染色体末端复制的端粒（telomere）（见 14.6 节）；③一个着丝粒（centromere）（有丝分裂时染色体分离所必需的）。它们必须有一个克隆位点，一个可以用于转化宿主细胞的标记基因，典型的宿主细胞是酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）。图 15.3 显示的是 YAC 载体，外源 DNA 已经克隆到载体中，载体本身只有 10kb 大，但它们可以插入 200～800kb 的外源 DNA 片段。



图 15.3 含有外源 DNA 的酵母人工染色体 YAC。 外源 DNA 被克隆到载体的 *Not* I 位点。端粒标为 TEL，着丝粒标为 CEN，复制起点标为 ARS（自主复制的序列），选择标记基因为 URA3（尿嘧啶核苷酸合成酶基因）。克隆载体转化的宿主细胞有一个基因发生了突变，它需要尿嘧啶才能正常生长（Ura^-）。转化有这个 YAC 载体的宿主细胞变为 Ura^+。图中未给出测量比例，插入 DNA 一般为 200～800kb 长，载体大小只有 10kb。

在确认 DNA 片段已经克隆到 BAC 或 YAC 中后，这个片段还可以进一步被亚克隆（subcloned）到质粒和细菌噬菌体中，进行更详细地分析和测序。尽管 YAC 可以容纳的插入片段比 BAC 大，但有一个更大的问题是，外源克隆 DNA 片段在酵母中比在大肠杆菌中更容易发生重组。因为这个原因，在基因组的克隆中，BAC 比 YAC 应用得更为广泛。

概念检查

已经构建了一些特殊的克隆载体用于基因组的测序和组装。一些像 M13 衍生物的载体，在克隆和进行 DNA 直接测序方面是非常有用的。另外一些像人工染色体，在克隆非常大的外源 DNA 片段方面是非常有用的，克隆片段可以接近百万碱基的大小。

◆ 比较几个载体克隆外源 DNA 的容量，M13、BAC 和 YAC。

◆ 酵母人工染色体能像酵母细胞中的一条染色体一样行使功能，是什么条件使其成为可能？

15.2 基因组测序

基因组的分析始于基因组文库的构建——用限制酶酶切基因组 DNA，然后对产生的所有的 DNA 片段进行分子克隆。一旦这个工作完成，测序工作才真正地开始。

鸟枪法测序

现今所有的基因组测序都是鸟枪法测序（shotgun sequencing）。这个技术是因为高通量、机械化的测序能力和强有力的计算能力而得以实现的。鸟枪法已经被用来测定从原核生物到真核生物的基因组的序列，包括人类基因组。

整个鸟枪法测序技术包括以随机的方式克隆完整的基因组，然后对克隆片段进行测序。被测序的克隆并不需要知晓克隆 DNA 片段的顺序和方向。序列测定后，用计算机分析、寻找重叠序列，然后再按照正常的顺序将重叠片段组装起来。

大多数用鸟枪法测出的序列是富足的。为了保证获得所有的序列，有必要测定大量的克隆，许多克隆可能是相同的或几乎相同的。一般，基因组的任意部分有 7～10 个序列覆盖。7～10 倍的覆盖率减少了序列上因为冗余可能发生的错误，可以使具有不确定性的序列在任意一个选择点上的核苷酸会有一定的一致性。

为了使鸟枪法测序更有效，有必要高效地克隆基因（需要大量的克隆），DNA 片段应该尽可能地随机产生。限制酶识别位点不是随机的，但是用一个在基因组中普遍存在的，识别一段很短 DNA 序列的限制酶切割基因组，会得到随机的酶切效果。为了得到更多的随机片段，DNA 可以通过喷雾器（nebulizer）被机械地剪切。这个装置有一个小喷嘴一样的开口，它可以使 DNA 溶液形成喷雾状，在这个过程中，DNA 被剪切。DNA 片段可以通过在凝胶中电泳，根据大小被纯化（见 7.7 节），然后克隆到载体中，再转化宿主细胞。

基因组的组装

一旦鸟枪法测序完成，所有的片段必须排序，这个过程被称为组装（assembly）。例如，组装一个原核生物的环状基因组，要将所有的片段按正常的顺序排列，去除重叠区，产生一个适合注释的基因组，以识别基因和其他功能区（见 15.3 节）。

有时候，鸟枪法测序和组装不能产生一个完整的基因组，有时候在序列中会存在着间隙（gap）。在这种情况下，需要寻找可以覆盖间隙的克隆。一种方法是设计与已知序列互补的特异性引物进行 PCR 扩增，覆盖间隙。在鸟枪法中，这些克隆是目的性的获得，不是随机的。在这些克隆的序列中包含重叠区，足够覆盖间隙。

一些基因组计划的目的是获得闭合的基因组，也就是完整的基因组序列。另外一些基因组停止在草图（draft）绘制的阶段，序列间有小的间隙。因为鸟枪法测序和组装是一个高度自动化的过程，而间隙序列的填补并不是自动化的，所以一个闭合的完整的基因组序列的获得比一个基因组草图的绘制花费更大。

概念检查

运用鸟枪法测序技术可以对小的基因组片段进行随机克隆和测序，然后运用重叠区的序列作为指导，最终获得完整的基因组序列。

◆ 为什么认为鸟枪法测序给出的基因组序列是精确的?

◆ 怎样进行基因组的组装?

15.3 基因组注释

基因组测序的最终目标不是为了获悉基因组的序列，而是定义出序列中所包含的基因。一旦基因组测序和组装完成，下一步是基因组的注释（annotation），即将基因组中的序列转变成一系列基因。

定位假定基因：鉴定 ORF

任何生物的大部分基因是编码蛋白质的，在许多微生物基因组内部，基因组的大部分是由编码区组成。因为真核微生物基因组的内含子比植物和动物少得多，原核生物中几乎没有内含子。微生物的基因组主要是由成千上万个可读框（open reading frame, ORF）组成，ORF 被调控区和转录终止子间隔开。一个功能性的 ORF 是指在细胞中编码蛋白质的基因。因此，定位编码蛋白质的基因或可能的编码蛋白质基因的最简单的方法是用计算机寻找基因组中的 ORF 序列。

计算机如何找到 ORF

在细胞内，核糖体在起始密码子（start codon）（通常是 AUG）处起始翻译一个可读框。然后核糖体到可读框的终止密码子（stop codon）处停止翻译（见 7.13 节）。寻找 ORF 的第一步是寻找这些序列信号。然而，识别可能的功能性的 ORF 比只是寻找可读框的起始和终止密码子要复杂得多，因为起始和终止密码子会以合理的频率随机地出现。因此还要寻找其他的线索。

一个线索是一个有功能的 ORF 有一定的大小。细胞中的大多数蛋白质包含 100 个或更多的氨基酸，所以大多数的功能性的 ORF 比 100 个密码子（300 个核苷酸）要长。然而简单地通过计算机程序忽略了小于 100 个氨基酸的 ORF 会错过一些功能基因。因此，还要考虑一些其他的因素。因为许多生物在同义密码子上会显示出密码子的偏爱性（codon bias）（见 7.14 节），密码子的偏爱性也会提供关于一个 ORF 是否有功能的线索。如果一个 ORF 使用的密码子与保守的密码子差别很大，这个 ORF 也许是没有功能的，或者是虽然有功能却是通过后来的基因转移获得的（见 15.8 节）。需要提醒的是，原核生物核糖体有可能不是从第一个起始密码子翻译起始，而是从 mRNA 的核糖体结合序列（Shine-Dalgarno sequence）的下游（见 7.16 节）起始的。因此，在原核生物的基因组内部寻找潜在的核糖体结合序列，会帮助识别 ORF 是否是有功能，以及哪个起始密码子真正地起作用。

图 15.4 显示出带有 ORF 特征的一段 DNA 序列，计算机会识别为一个“hit”。因为任何一个基因都是从一条单链转录得到（除了最小的质粒和病毒基因组，在一些基因组的一些部分，两条链都会被转录）。因此计算机需要对 DNA 的两条链进行检查。图 15.4 显示基因组的一个区，在图中一个基因是从一条链上进行转录，而另外一个基因是从另外一条链上进行转录。当然，一些基因编码 tRNA 和 rRNA，这些基因是不会被只能寻找 ORF 的程序所识别。然而，编码 tRNA 和 rRNA 的基因通常比较容易定位，因为这些 RNA 的序列是高度保守的（见 7.15 节和 11.5 节～11.7 节）。

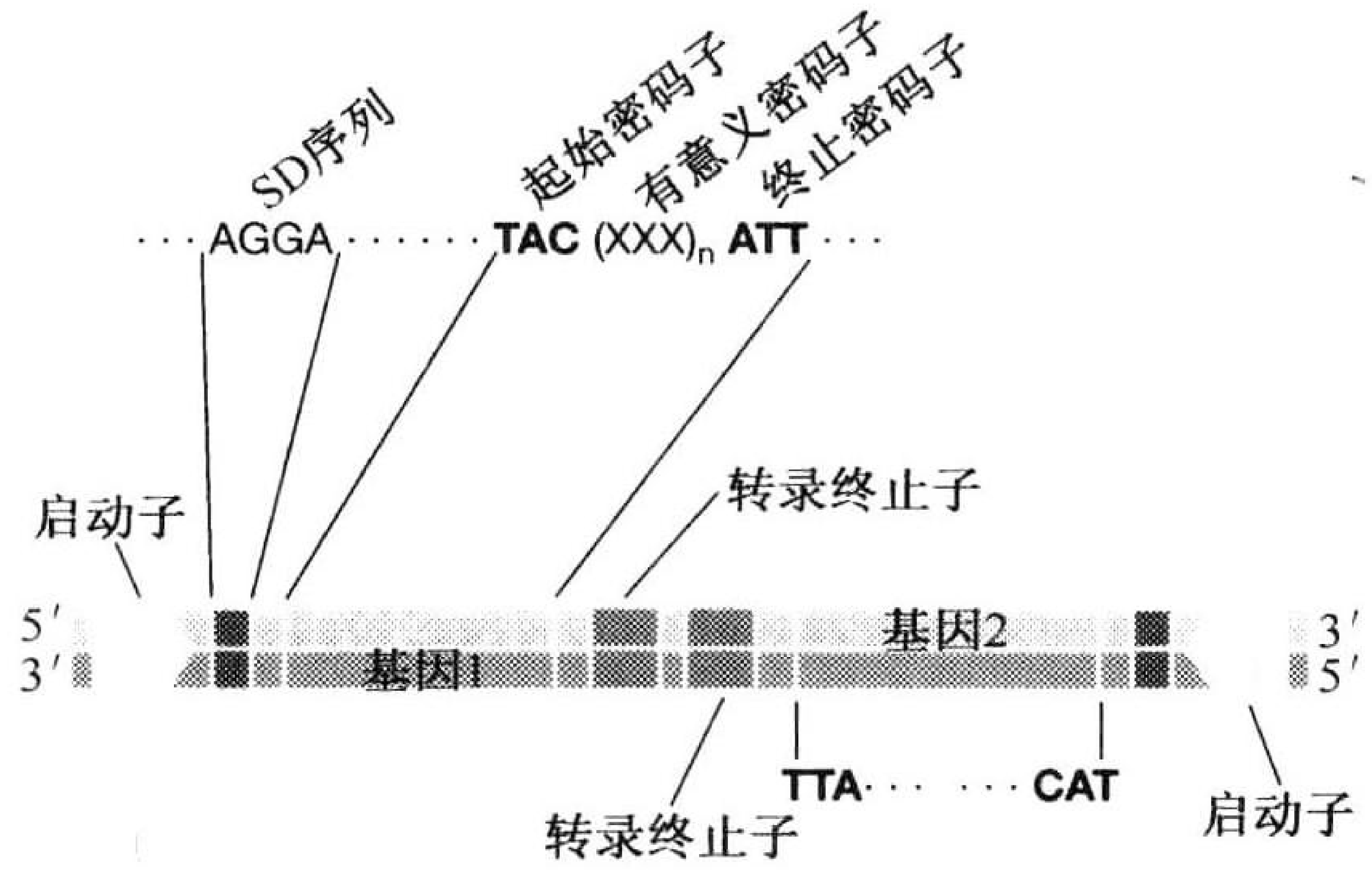


图 15.4 可能的功能性的可读框的定位。序列显示的是一条链上的基因 1，包含 1 个可能的核糖体结合序列（AGGA），距离起始密码子（ATG）有 8 个碱基。编码起始密码子的下游是 100 个有意义的密码子，然后是一个终止密码子（无意义）（UAA 是使用最广泛的终止密码子。在基因 1 ORF 的 DNA 分子内，ORF 上游是一个启动子，下游是一个转录终止子。基因 2 如图所示，其组成和基因 1 一样，但转录方向相反。核糖体结合序列，起始密码子，有意义密码子，和终止密码子只在 RNA 水平上有功能。这里我们显示的是编码功能序列的 DNA 碱基。

假定基因的定位：基因组比较

如果一个 ORF 的序列和另外一个生物的基因组的 ORF 的序列相似，那么它很可能是有功能的（不管它们是否编码已知蛋白质），或者是 ORF 的一段序列编码蛋白质的一个功能区。这是因为在不同细胞中，有相同功能的蛋白质往往是同源（homologous）的，也就是这些蛋白质在进化上是相关的，它们在序列和蛋白质结构上相似。计算机在基因注释的过程中，可以寻找这些序列的相似性。

如果没有精细的计算工具去处理大规模的数据，就不可能完成基因组的组装，甚至是很小的原核生物的基因组的组装，以及基因和其他重要功能 DNA 序列的定位。利用计算机进行的这种精细分析被称为“*in silico*”（“*in silico*”是指计算机内部的硅处理芯片），这个词类似于术语“*in vivo*”和“*in vitro*”。图 15.5 显示的是通过鸟枪法测序用计算机构建的 4.4Mb 的结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，肺结核的病原菌）的基因组遗传学图谱（见 26.5 节）。一个很详尽的图谱，所有的 ORF 及编码 tRNA，rRNA 的基因和其他的一些序列被指示出来。

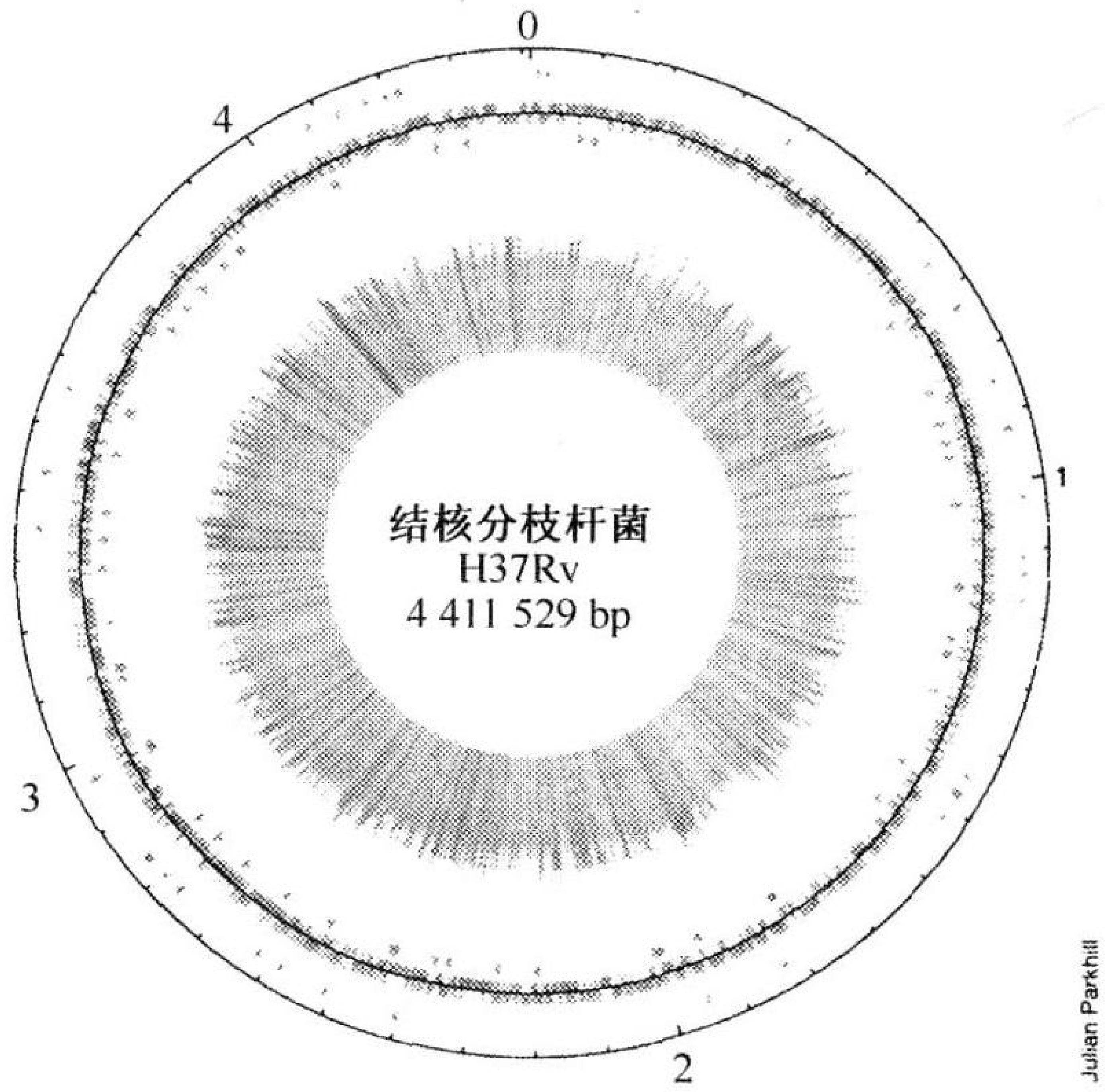


图 15.5 结核分枝杆菌的染色体图谱。 外面的圆圈显示的是染色体的大小（Mb），DNA 的复制起点作为 0。里面的圆圈显示的是 tRNA 基因（蓝色）和单一的 rRNA 操纵子（橙色）的定位。再里面的圆表示顺时针转录的 ORF（深绿）和逆时针转录的 ORF（浅绿）。接着下面的圆显示的是一些重复的 DNA 序列的定位，包括插入序列（橙色）。中间的柱状图显示的是区域的 GC 含量（见 11.10 节），黄色线显示的区域 GC 含量低于 50%，橙色线显示的区域 GC 含量高于 65%。结核分枝杆菌的其他讨论见 12.23 节，结核病见 26.5 节。图片是用 DNASTAR 软件产生，经过 *Nature* 393：537～544（1998）的允许重新印刷，Macmillan Magazines Ltd.。

概念检查

完成序列测定后，基因的注释大部分是通过计算机搜索 ORF，一部分是通过寻找编码同源蛋白的基因序列。

◆ 什么是可读框（ORF）？

◆ 如何利用蛋白质的同源性注释基因？

Ⅱ 微生物的基因组

至今已经完成了大概有 250 个微生物的基因组的测序，大部分是原核生物，上百个其他生物的基因组测序计划正在进行中。这里，我们只讨论少数几个生物，探究一下这些基因组的分析告诉了我们一些什么样的信息？

15.4 原核生物的基因组：大小和 ORF 含量

已经可以在公共的数据库中搜索到上百个原核生物的基因组（基因组最新的序列在网址 http：//www.genomesonline.org/处可以找到）。这包括许多细菌（*Bacteria*）和

古生菌（*Archaea*），包括环状和线状基因组。表 15.1 列出的是一些具有代表性的例子。尽管原核生物基因组的测序变得越来越常规和快速，一个完整的基因组的测序和分析还是需要巨大的财力和人力。因此，在开始基因组测序之前，还需要考虑科学、社会的因素以及是否有充足的财力支持。

表 15.1 原核生物的基因组[a]

生物	大小/bp	ORF[b]	评价
细菌			
生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*)	580 070	470	已知的最小的细胞基因组(见 12.21 节)
肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)	816 394	677	引起肺炎(见 12.21 节)
布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)	910 725	853	螺旋菌,有线状基因组,引起莱姆疾病(见 12.33 节和 27.4 节)
砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)	1 042 519	894	专性细胞内寄生虫,人的病原菌(见 12.27 节和 26.13 节)
普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*)	1 111 523	834	专性细胞内寄生虫,引起传染性斑疹伤寒症(见 12.13 节和 27.3 节)
苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)	1 138 006	1041	螺旋菌,引起梅毒(见 12.33 节和 26.12 节)
产液菌 *Aquifex aeolicus*	1 551 335	1544	超嗜热菌,自养生物(见 12.37 节)
海洋原绿球藻 (*Prochlorococcus marinus*)	1 657 990	1716	海洋中含量丰富的光能利用菌(见 12.26 节和 19.6 节)
幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)	1 667 867	1590	引起胃溃疡(见 26.10 节)
酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)	1 852 442	1752	病原体,引起喉咙疾病和猩红热(见 26.2 节)
海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)	1 860 725	1877	超嗜热菌(见 12.36 节),见图 15.7
绿硫菌 (*Chlorobium tepidum*)	2 154 946	2288	模式的光养细菌(见 12.32 节)
金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)	2 814 816	2593	主要引起医院的感染(见 12.19 节和 25.7 节)
耐放射异常球菌 (*Deinococcus radiodurans*)	3 284 156	2185	抗辐射,含有多条染色体(见 12.34 节)
集胞蓝细菌 (*Synechocystis* sp.)	3 573 470	3168	蓝细菌(见 12.25 节)
食菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*)	3 782 950	3584	其他原核生物的寄生虫(见 12.14 节)
硫还原土杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*)	3 814 139	3467	生物治理的模式生物(见 17.18 节)
新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*)	4 016 942	3767	生命周期复杂(见 12.16 节)
枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)	4 214 810	4100	革兰氏阳性菌的遗传学模式生物(见 12.20 节)

续表

生物	大小/bp	ORF[b]	评价
细菌			
结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)	4 411 529	3924	引起肺结核(见 12.23 节和 26.5 节)
大肠杆菌 (*Escherichia coli*)	4 639 221	4288	革兰氏阴性菌的遗传学模式生物(见 12.11 节)
炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)	5 227 293	5738	病原菌,生物战的病原菌(见 12.20 节)
沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)	5 459 213	4836	代谢多样,不需氧的光养生物(见 12.2 节)
铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)	6 264 403	5570	代谢多样,条件致病菌(见 12.7 节)
天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)	8 667 507	7825	含有线状染色体,产生抗生素(见 12.24 节)
大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)	9 105 828	8317	固氮,使大豆形成根瘤(见 19.22 节)
古生菌			
骑火球纳米古生菌 (*Nanoarchaeum equitans*)	490 885	552	已知的最小的基因组(见 13.11 节)
嗜酸热原体 (*Thermoplasma acidophilum*)	1 564 905	1509	嗜热,嗜酸(见 13.5 节)
詹氏甲烷嗜温球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*)	1 664 976	1738	产烷生物(见 13.4 节)
敏捷气热菌 (*Aeropyrum pernix*)	1 669 695	1841	极端耐热菌(见 13.9 节)
炽热火球菌 (*Pyrococcus horikoshii*)	1 738 505	2061	极端耐热菌(见 13.6 节)
甲烷嗜热杆菌属的一个种 (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*)	1 751 377	1855	产烷生物(见 13.4 节)
闪烁古生球菌 (*Archaeoglobus fulgidus*)	2 178 400	2436	极端耐热菌(见 13.7 节)
盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*)	2 571 010	2630	极端释盐菌,噬菌调理素(见 13.3 节)
硫磺矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*)	2 992 245	2977	极端耐热菌,硫磺化能营养(见 13.9 节)

a. 这些和上百个其他原核生物的基因组的信息可以在 TIGR 数据库(www. tigr. org/tdb)找到,一个由 The Institute for Genomic Research(TIGR),Rockville,MD,非营利性的研究所维持的网站,http://www. genomesonline. org 那里还列出了另外一些相关网站的连接。

b. 可读框。报告可读框的目的是预测一种生物所编码的蛋白质总数。当然,包括编码已知蛋白质的基因,所有的编码氨基酸数大于 100 的蛋白质的 ORF。其中不包括小的 ORF,除非它们显示出与其他生物有同源性或者是密码子的使用是所研究的生物中比较典型的。

表 15.1 列出的原核生物的基因组包含有几个病原菌。一般,这些微生物在基因组测序上有很高的优先权。表中列出的极端耐热菌在生物技术上有很重要的作用,因为这些生物的酶是热稳定的(见 6.10 节、6.12 节、13.12 节和 30.9 节)。事实上,生物制药

和生物技术产业的需求对基因组测序兴趣的产生和资金的提供具有重要的导向作用。然而表 15.1 列出的还包括枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）和铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*），这些作为遗传模式菌仍然在被广泛地研究，而新月柄杆菌（*Caulobacter crescentus*）是作为细胞分化的模式菌（见 12.16 节）。

原核生物基因组的大小

对不同种细菌和古生菌等原核生物的基因组进行分析，发现基因组的大小和它的 ORF 的含量有很强的相关性（图 15.6）。事实上，不管是何种生物，每 100 万个碱基的原核生物其基因组 DNA 编码 1000 个 ORF（图 15.6）。这不像真核生物，非编码的 DNA 占了基因组很大的一部分（尤其是基因组比较大的生物，见表 15.3），在原核生物中，随着基因组的增大，基因的数目也成比例地增加。

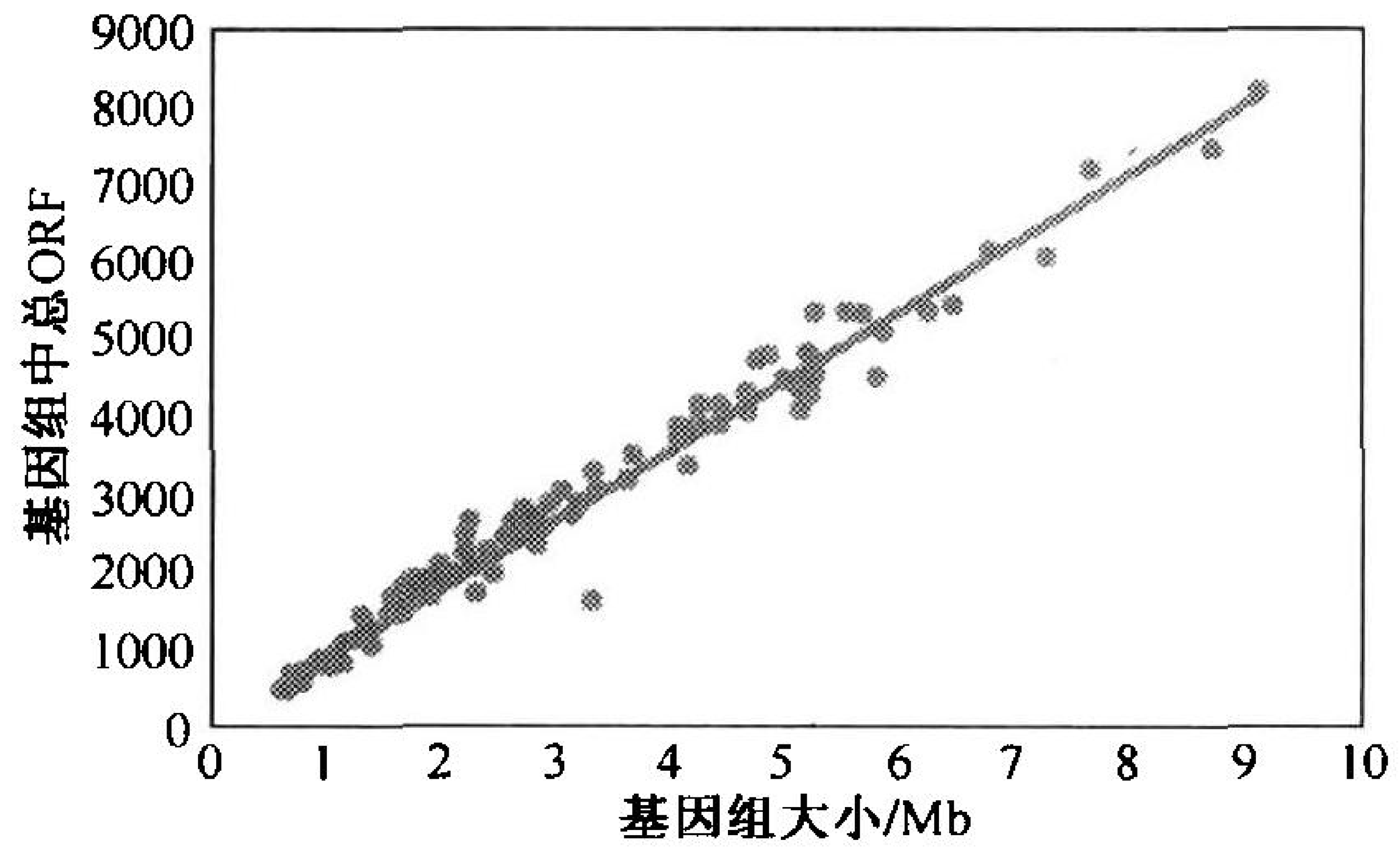


图 15.6 原核生物基因组的大小和 ORF 含量的关系。这些数据来源于已完成的 115 个原核生物基因组分析的结果，包括细菌和古生菌。数据来源于 *Proc Natl Acad Sci*（*USA*）101：3160～3165（2004）。

对基因组序列进行分析可以帮助我们回答一些基本的生物学问题。例如，生殖道支原体（*Mycoplasma genitalium*）和肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*）的小基因组分析显示：在生殖道支原体中所有的 470 个 ORF 同样存在于肺炎支原体中。通过寻找其他生物中的同源基因和利用转座子突变技术决定哪些基因是非必需的，科学家们推算出大概有 300 个编码蛋白质的基因足够维持细胞的生存。已知的生物中都含有这些基因。然而，一些值得被关注的生物含有相对较小的基因组。例如，詹氏甲烷嗜温球菌（古生菌）（*Methanocaldococcus jannaschii*）是个自养生物（见 13.4 节和 17.7 节），它只含有 1738 个 ORF。这就足够使它不仅可以独立生存，还可以利用 CO_2 合成细胞内所需要的组分。产液菌 *Aquifex aeolicus* 也是一个自养菌，它含有自养生物中最小的基因组，只有 1.5Mb（表 15.1）。产甲烷极端嗜热球菌和产液菌都是极端耐热的。因此同样也令人感到惊奇的是，可以得出结论，在沸水中生活的自养生物不需要很大的基因组就足以维持它们的生存。

表 15.1 还列出了一些相对较小的基因组。测序策略对小基因组来说相对简单，因此在早期的测序工作中，还是比较重视小基因组的测序。生殖道支原体的基因组比一些病毒的要小，如小球藻病毒（*Chlorella viruses*）（见 16.6 节）和细菌噬菌体 G（见 9.2 节）。最小的已知的原核生物基因组，甚至比生殖道支原体还要小的是骑火球纳米古生

菌（*Nanoarchaeum equitans*）。它的基因组比生殖道支原体小 90kb（表 15.1）。骑火球纳米古生菌是个极端耐热菌，是另外一个极端耐热菌——火焰球菌属（*Ignicoccus*）（见 13.11 节）的寄生菌。对骑火球纳米古生菌的基因进行分析，发现它所有编码蛋白质的基因都和合成代谢和分解代谢有关。更有趣的是，骑火球纳米古生菌的 ORF 的数量多于基因组比它大的生殖道支原体 ORF 的数量（表 15.1）。这是因为骑火球纳米古生菌的基因组排列非常的紧凑，几乎不含有非编码 DNA。

一些原核生物有非常大的基因组。例如，大豆慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium japonicum*）能在大豆的根部形成固氮的根节（见 19.22 节），它含有的 ORF 数量比真核生物酿酒酵母（见 15.6 节和表 15.1）多了 2800 个。天蓝链霉菌（*Streptomyces coelicolor*）基因组呈线型，大小为 8Mb，属于典型的链霉菌基因组，有 7864 个 ORF，比酿酒酵母多了 1800 个。一些更大的真核生物基因组大小是已知的，但它们的序列还没有完成。这包括都是滑行细菌（见 12.17 节）的黄色黏球菌（*Myxococcus xanthus*）9.2Mb 的染色体和纤维堆囊菌（*Sorangium cellulosum*）12.3Mb 的染色体。这是已知的最大的原核生物的基因组。在古生菌中还没有找到与其相似大小的基因组（表 15.1）。原核生物基因组的大小范围从大的病毒到小的真核生物。

概念检查

原核生物的基因组大小为 0.49～9.1Mb。最小的原核生物基因组大小和最大的病毒的一样，最大的原核生物基因组的基因数比一些真核生物的还要多。在原核生物中，ORF 的含量和基因组的大小是成比例的。

◆ 大豆慢生根瘤菌比骑火球纳米古生菌多了多少个基因？这对这两种生物的生活方式带来了怎样的影响。

◆ 4Mb 的基因组大概含有多少个 ORF?

15.5 原核生物的基因组：生物信息学分析和基因分布

基因组进行组装和注释完成后，接着进行的分析是基因的比较阶段。最基本的问题是“这个生物中的基因和另外一个生物的基因比较的结果如何?”这些分析将刚完成测序的基因组与其他生物的基因组放在一起进行比较。这些工作是生物信息学（bioinformatics）的主要部分。

原核生物基因组中基因的含量

在许多方面，一个生物所包含的基因决定了它的生物学特性。换句话说，一个生物的基因组是由它的生活方式所决定。可以想像，例如，一个专性寄生生物苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）（见 26.12 节），它只需要相对较少的基因用于氨基酸的合成，因为它所需要的氨基酸全由它的宿主细胞提供。事实上，计算机对苍白密螺旋体基因组进行的分析显示，尽管它编码几个蛋白酶，能够将从宿主细胞吸收的多肽转化成氨基酸，但它缺少氨基酸合成的基因。相比较而言，非寄生的大肠杆菌含有 131 个基因涉及

氨基酸的合成和代谢，而枯草芽孢杆菌含有 200 多个这样的基因。

基因组的分析比较在寻找编码一些酶的基因方面非常有用，因为一种生物所具有的已知的特性，在其基因组中肯定存在着编码这些酶的基因。例如，海栖热袍菌（*Thermotoga maritima*）（极端耐热的海洋菌）是在高温的海洋的沉积层中发现的极端耐热菌，已知它可以分解许多的糖类。图 15.7 列出了通过对海栖热袍菌进行基因组分析后总结的一些代谢途径和运输系统。跟预期的相符，基因组中富含一些涉及运输，特别是运输碳水化合物和氨基酸的酶。基因组中的大部分（7%）涉及简单和复杂多糖的代谢。这些表明海栖热袍菌生活在富含有机物的环境里。

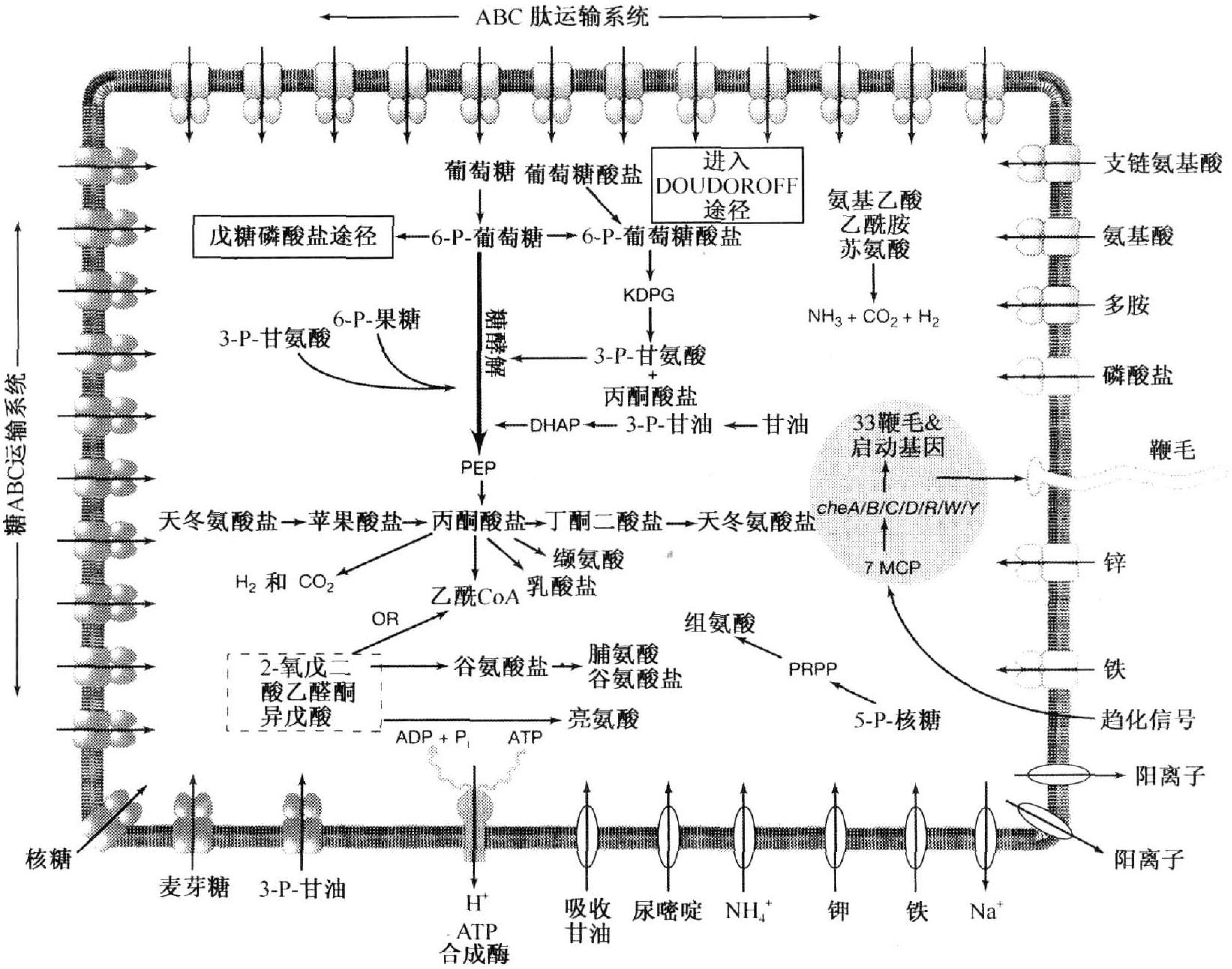


图 15.7 海栖热袍菌的代谢途径和运输系统。此图显示的是这个生物代谢的蓝图。它包括能量的产生和一些有机复合物的代谢途径，以及和运输相关的蛋白质，通过对基因组序列的分析，这些基因已经被鉴定出来。基因的名称没有显示出来。基因组中含有几个 ABC 转移系统（见 4.7 节）。其中 12 个基因与碳水化合物的运输有关，14 个和多肽氨基酸有关，其他的和铁离子运输有关。在图中，这些转移蛋白显示的是多亚基结构。也鉴定出来了其他形式的转运蛋白，以单个圆表示。鞭毛被显示出来，这种生物有 7 个传感器（MCP），几个趋化基因（见 8.13 节）和几个与鞭毛装配相关的基因（见 4.14 节）。糖代谢的几个途径也显示出来。这张图引自基因组研究所（TIGR）已经公布的工作。

表 15.2 中列出了原核生物中基因的分类和它们的功能分析。每一个新近完成测序和注释的基因组公布后，都会总结出来一组这样的数据。很明显，在原核生物中基因的

分配很清楚。例如，在原核生物的基因组中，尽管随着基因组大小的减少，与翻译相关的基因数目会和参与代谢的基因数目相近，但很大一类的基因仍然是和代谢相关的（表 15.2 和图 15.8）。令人惊奇的是，在原核生物的基因组内，一些同样对细胞很重要的基因，如与 DNA 复制和转录相关的基因只占了很小的一部分。

表 15.2　细菌基因组中的基因功能

功能分类	染色体中不同类基因所占的比例		
	大肠杆菌 (4.64Mb)[a]	嗜血流感病毒 (1.83Mb)[a]	生殖道支原体 (0.58Mb)[a]
代谢	21.0	19.0	14.6
结构	5.5	4.7	3.6
运输	10.0	7.0	7.3
调节	8.5	6.6	6.0
翻译	4.5	8.0	21.6
转录	1.3	1.5	2.6
复制	2.7	4.9	6.8
其他已知的	8.5	5.2	5.8
未知的	38.1	43.0	32.0

a. 染色体的大小，列出的每种生物只含有一个单一的环状染色体。

未鉴定功能的 ORF

尽管生物和生物之间有所不同，但在大多数情况下，基因组中被鉴定出的基因数是鉴定出的 ORF 数的 70%或更少。未鉴定出的 ORF 被认为编码假定蛋白质（hypothetical protein），尽管我们不知道蛋白质的功能，但蛋白质确实存在。一个未鉴定出的 ORF 包含所有的编码蛋白质基因所具有的特征——一个核糖体结合位点（或是在 Shine-Dalgarno 位点下游的操纵子内的一个起始位点）、一个起始密码子和一个终止密码子，但与任何一个编码已知蛋白质的氨基酸序列不具有同源性。

未鉴定出的 ORF 反映出的一个事实是原核生物的基因中还有很多是未知的。另一方面，当一种生物的基因功能被鉴定出来，在另一种生物中与它同源的未鉴定出的 ORF 也许翻译相同的蛋白质。有趣的是，即使是世界上被了解最多的大肠杆菌，其 4300 个基因中也只有 2700 个基因的功能是已知的。而鉴定出的大部分基因涉及大分子的合成及与大肠杆菌生长相关的重要的代谢途径。因此随着许多未知 ORF 的功能被鉴定出来，它们中的大多数应该是编码非必需蛋白质或者是多余蛋白质的基因。随着假定蛋白质的鉴定，大肠杆菌中涉及大分子的合成及重要代谢途径的基因的比例会降低（表 15.2）。可以预测，大肠杆菌中很多未鉴定的基因编码的是一些执行调控功能的蛋白质，那些只有在特殊情况下或者是分解不寻常的底物时所需要的蛋白质，或者是那些含量丰富，参与重要的代谢反应后备系统的蛋白质。

根据基因组大小进行基因分类

如表 15.2 所示，一个生物中参与细胞的一个或另一个功能的基因比例在某种程度上由基因组的大小决定。这从图 15.8 中列出的许多种细菌的大量基因组信息中可以总结出来。从这个图可以看出，参与蛋白质合成基因的比例在基因组比较小的生物中有很

大的提高。相反，参与转录和调控基因的比例（包括2个组分的调控系统，如信号转导，表15.2）在基因组比较大的生物中有很大的提高。其他核心的细胞过程，如与DNA复制和能量产生有关的基因数目随着基因组大小变化很小（图15.8）。

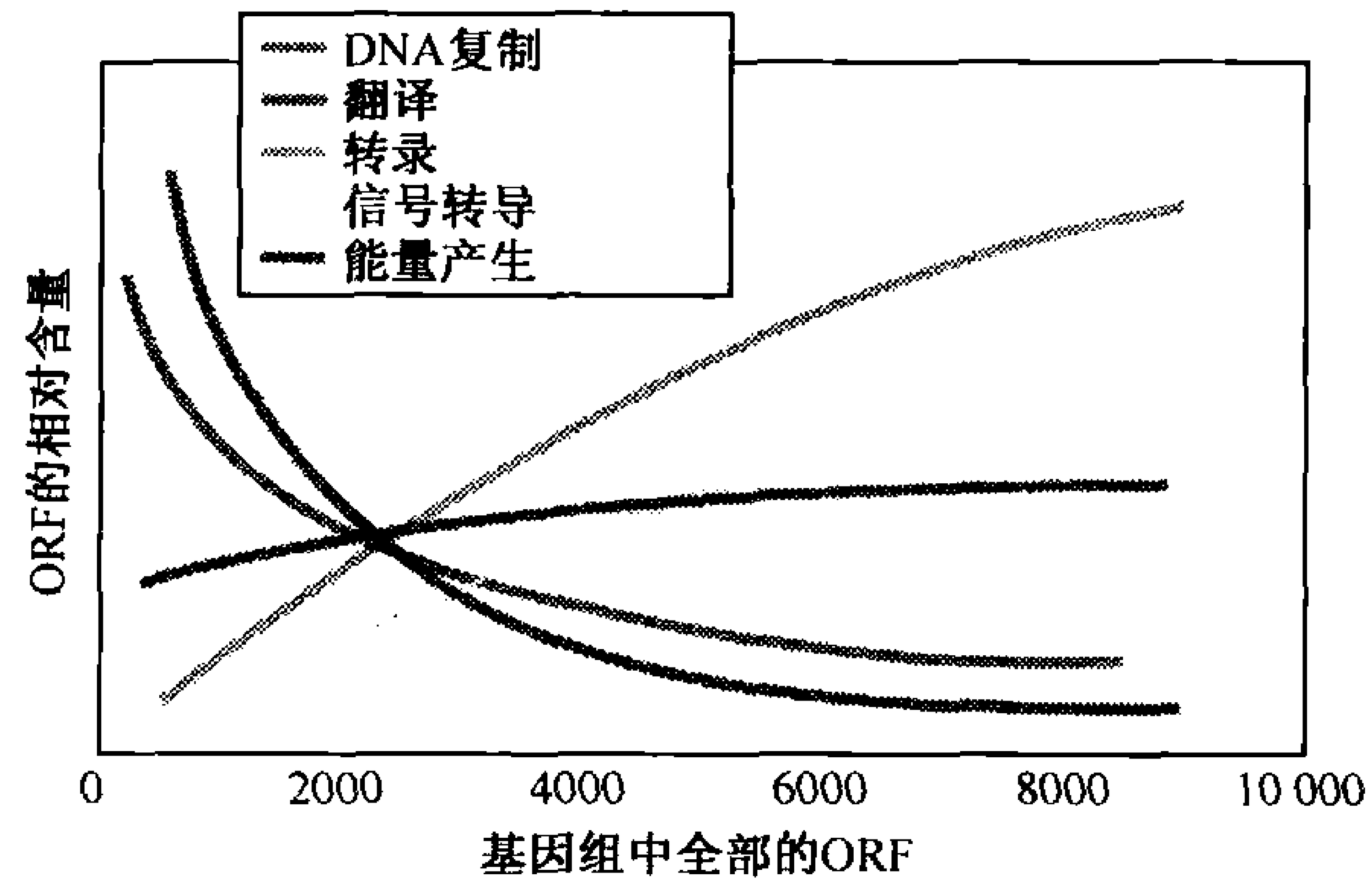


图15.8 基因组中不同类别基因的ORF数目随着总基因组大小变化，其所占比例的变化。图中显示的是在小基因组生物中，编码与翻译、DNA复制相关的蛋白质基因的比例是如何增加的，而在大基因组生物中，与转录调控相关的基因比例是如何增加的。数据来自于 *Proc Natl Acad Sci*（*USA*）101：3160～3165（2004）。

从图15.8中总结出的基因组分析结果显示，尽管许多基因是非必需的，但是和蛋白质合成相关的基因都是必需的。基因组越小，参与翻译过程的基因数目越多（表15.2）。另一方面，基因组比较大的生物，含有的涉及转录和调控的基因数目比基因组小的生物要多。这些调控系统使得细胞可以通过特异基因的表达去更好地利用它可以获得的资源。在小基因组的生物中，调控过程不是必需的，因为小基因组的原核生物一般是寄生的，它可以从宿主细胞中获得许多需要的物质。相反，基因组比较大的生物，在它的基因组内含有许多与调控和特殊代谢相关的基因。这使得这些生物在它的生存环境中更具有竞争力。对于基因组比较大的原核生物，生存环境通常是土壤。土壤作为生态环境，碳和能量的来源一般比较缺乏或者是只能间接地获得，并且有很多种不同的形式（见19.2节和19.4节）。在这种环境中，大基因组编码的几种代谢途径可以被环境强烈地选择。有趣的是，表15.1中列出的所有的原核生物，它们的生存环境都是土壤，它们的基因组都超过了6Mb。

细菌和古生菌的基因分布

在表15.2中，除了3种细菌，还对几种原核生物的基因进行了分类。比较结果如图15.9所示。图中显示的是几种生物的基因组，包括细菌和古生菌基因的平均含量。平均起来，古生菌中参与能量和辅酶产生的基因在整个基因组中所占比例要高于细菌［这些结果还是有些偏差的，因为大部分新的辅酶是由产甲烷的古生菌产生的（见13.4节和17.17节）］。另一方面，古生菌中参与碳水化合物代谢或细胞膜功能（如运输和细胞膜合成）的基因要比细菌的少。

尽管在这两种原核生物中，古生菌存在的不确定性要多于细菌（图15.9），但它们都含有相对大量的基因，其功能是未知的或编码的是假定蛋白质。因此，基因组的大小

除了控制基因数目（图 15.8），它在细胞水平也有一定的控制（图 15.9）。这些数据是细菌和古生菌在生活方式上存在差别的一个反映，这些差别以后还会阐述。

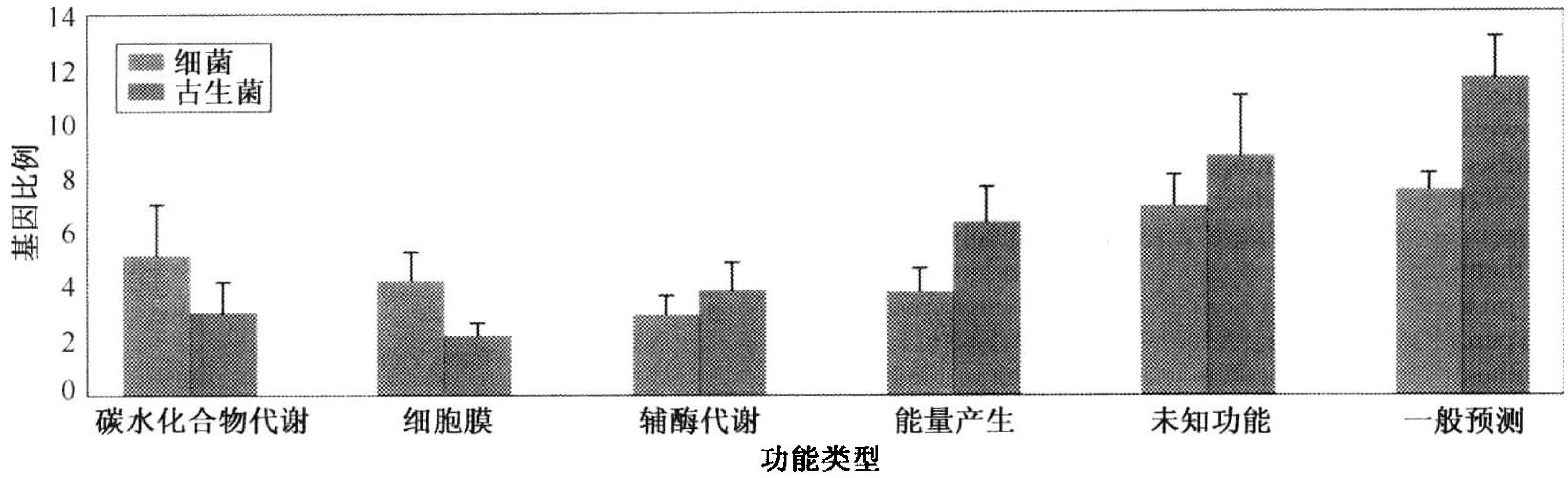


图 15.9　细菌和古生菌基因种类的差异。数据来源于 34 种细菌和 12 种古生菌。"未知功能"代表那些已知是编码蛋白质的基因，但功能未知。"一般预测"是指编码一些存在或不存在的假定蛋白质。数据来源于 *Proc Natl Acad Sci*（*USA*）101：3160～3165（2004）。

概念检查

许多基因由于其序列与其他生物的基因有同源性能够被鉴定出来。然而还有大量已经测序的基因功能是未知的。平均来说，细菌和古生菌的基因是相关的，但又截然不同。生物信息学在基因组的分析中起了非常关键的作用。

◆ 是否每一个有功能的 ORF 都编码一个蛋白质？

◆ 什么是假定蛋白质？

◆ 原核生物中哪类基因的比例最多？

15.6　真核微生物的基因组

许多真核微生物是已知的，至今，一些微生物和高级真核生物的基因组测序已经完成（表 15.3）。酿酒酵母是一个非常重要的真核生物，因为它在工业生产中的广泛应用（见第 30 章），并且可作为细胞生物学的模式生物，所以在这里我们集中讨论它。

酵母的基因组

单倍体酵母基因组包含有 16 条染色体，大小为 220～2352kb。整个酵母的核基因组（除了线粒体，一些质粒还有一些类似于病毒的遗传元件外）大概是 13 392kb。读者也许会觉得奇怪，既然全基因组测序已经完成，为什么还用"大概"这个词。像其他的真核生物一样，酵母有大量重复的 DNA 序列（见 7.4 节）。酵母的基因组于 1997 年公布，并不是所有的"相同"的重复序列序列都已经被测出。对一段长得非常相似的或几乎相同的序列进行测序，并且将数据组成一个连续的框架是比较困难的。例如，酵母的Ⅻ号染色体，含有一段将近 1260kb 的区域，包含有 100～200 个酵母 rRNA 基因的重复序列。在这段长的 rRNA 基因的重复序列后面，还有另外一段重复序列。因为这段

区域的序列还没有完全测出，所以还不知道酵母基因组的精确大小。

酵母基因组除了含有 100～200 个相似的 rRNA 操纵子外，还有 275 个编码 tRNA 的基因（只有一部分是相同的），有 80 个基因是其他形式的非编码 RNA（见 7.16 节）。在酵母中，已经预测出了 6340 个可能的 ORF，但是更详细的分析将会把这个数字减少到 5570 个，这比一些原核生物的还要少（表 15.1）。在这些 ORF 中，有将近 3400 个是编码已知功能的蛋白质。大量的遗传学和生物化学技术使得在研究这个生物其他蛋白质的功能方面，取得了巨大的进展（见 15.11 节）。

酵母的小基因组和内含子的存在

在酵母所有已知的基因中，哪些基因是必需的？在酵母和其他微生物中，解决这个问题的方法就是通过敲除（knockout mutation），引入基因突变（见 10.14 节）。敲除就是通过突变使一个基因丧失功能。通常，如果在一个单倍体中，一个基因对细胞的生存是必需的，那么就得不到这个基因的敲除突变株。然而，酵母存在双倍体的状态（见 14.7 节）。先在双倍体中获得突变，然后再研究这个突变是否能存在于单倍体中，就可以测定某一个特殊的基因对细胞的生存是否是必需的。用这种技术，人们惊奇地发现，酵母中至少有 877 个 ORF 是必需的，而有 3121 个 ORF 不是必需的。这个关键基因的数目比预计的原核生物细胞存在所必需的最小基因数目 300 个要多（见 15.3 节）。因为真核生物比原核生物更复杂，所以生存所必需的最小基因数目也要多些。

因为酵母是真核生物，它含有内含子（见 7.1 节）。然而，在酵母编码蛋白质的基因内部总共只有 225 个内含子。大多数含有内含子的基因，都是在靠近基因的 5′端有一个小的内含子。这个位置和表 15.3 显示的高等生物基因组中内含子的位置有很大的不同。例如，在线虫（*Caenorhabditis elegans*）中，平均一个基因内部有 5 个内含子，在果蝇（*Drosophila*）中，平均一个基因内部有 4 个内含子。在拟南芥（*Arabidopsis*）基因组中，内含子普遍存在，平均一个基因内部有 5 个内含子，大约有 75%的拟南芥基因内有内含子。在人的所有编码蛋白质的基因中，都有内含子，但一个基因内有 10 个或更多的内含子并不常见。在这些生物中，内含子比外显子要大。

其他的真核生物

其他的几个值得注意的真核微生物的基因组测序也已经完成。恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）是引起疟疾的寄生虫（见 27.5 节）；经过多个国家的努力合作，基因组测序已经完成。恶性疟原虫的基因组为 27Mb，有 14 条染色体，大小为 0.7～3.4Mb。小胞子虫（*Encephalitozoon cuniculi*）是能够引起人和其他动物肺部感染的体内病原菌。小胞子虫缺少线粒体（见 14.9 节），尽管它的单倍体基因组内含有 11 条染色体，但它的基因组大小只有 2.9Mb（表 15.3）；这比许多原核生物的基因组都要小（表 15.1）。玉米黑粉菌（*Ustilago maydis*）是一种植物病真菌，基因组大小为 20Mb。它能引起玉米的黑穗病，这种病害会给社会带来巨大的经济影响。

其他真核微生物的基因组测序工作也已经取得了很大的进展，主要是些病原真菌，包括硕大利什曼原虫（*Leishmania major*）[利什曼病（leishmaniaisis)]，白色念珠菌（*Candida albicans*）（不同的致病酵母，见 27.8 节），痢疾内变形虫（*Entamoeba histo-*

lytica）（见 14.9 节和 28.8 节），吸吮贾第虫（*Giardia lamblia*）（见 28.6 节）和卡氏肺囊虫（*Pneumocystis carinii*）（AIDS 并发的肺炎，见 26.14 节）。除此之外，鼠和兔的全基因组序列也已知。人的基因组测序已经完成，但基因的注释还没有完成（表 15.3）。

表 15.3 一些真核生物的核基因组[a]

生物	评价	基因组大小/Mb	染色体数目	编码蛋白质的基因[b]
小胞子虫（*Encephalitozoon cuniculi*）	非常小的基因组，人致病菌	2.9	11	1997
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）	这个酵母是工业上非常重要的生物（见 30.10 节和 30.13 节），也是生化和遗传学研究的模式生物	13	16	5570
线虫（*Caenorhabditis elegans*）	一种圆的虫子，是研究动物发育的重要的模式生物	97	6	19 099
果蝇（*Drosophila melanogaster*）	是一种集中进行研究的模式昆虫	180	4	13 601
拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）	作为遗传学研究的一种模式植物	125	5	25 498
鼠（*Mus musculus*）	一种哺乳动物的模式系统	2500	23	30 000
人（*Homo sapiens*）	基因组只能以草图的形式获得	3000	23	25 000～35 000[c]

a. 所有这些数据是这些生物的单倍体核基因组。

b. 所有这些基因的数目是根据已知的基因数目和那些类似编码功能蛋白质序列的数目估计出来的。

c. 有两个不同的研究小组绘制了人类基因组的草图，但人类基因组的基因数目仍然有争论，基因数目大概是 60 000。

概念检查

酿酒酵母的全基因组测序已经完成，其他许多真核生物的基因组序列也已经完成。酵母基因组编码 5570 个蛋白质，只有 887 个蛋白质是其生存所必需的。酵母中编码蛋白质的基因中很少含有内含子。

◆ 怎样能证明一个基因是必需的？

◆ 真核生物小胞子虫的基因组有什么特殊之处？

Ⅲ 其他基因组和基因组的进化

除了细胞，其他细胞结构也有基因组，包括细胞器和病毒。在这里，我们讨论细胞器的基因组和一些基因组进化的问题。我们最后讨论的是如何在基因组中寻找感兴趣的基因。

15.7 细胞器的基因组

细胞中主要的细胞器，如线粒体和叶绿体，它们都有自己的 DNA（见 14.4 节）。

线粒体和叶绿体都是来源于内共生细菌（见 11.4 节和 14.4 节）。因此，细胞器 DNA 编码的蛋白质与细菌的同源性比与真核生物和古生菌的更接近，这点并不令人感到惊奇。线粒体的基因组比较复杂。我们先从可以进行光合作用的细胞器——叶绿体开始进行讨论。

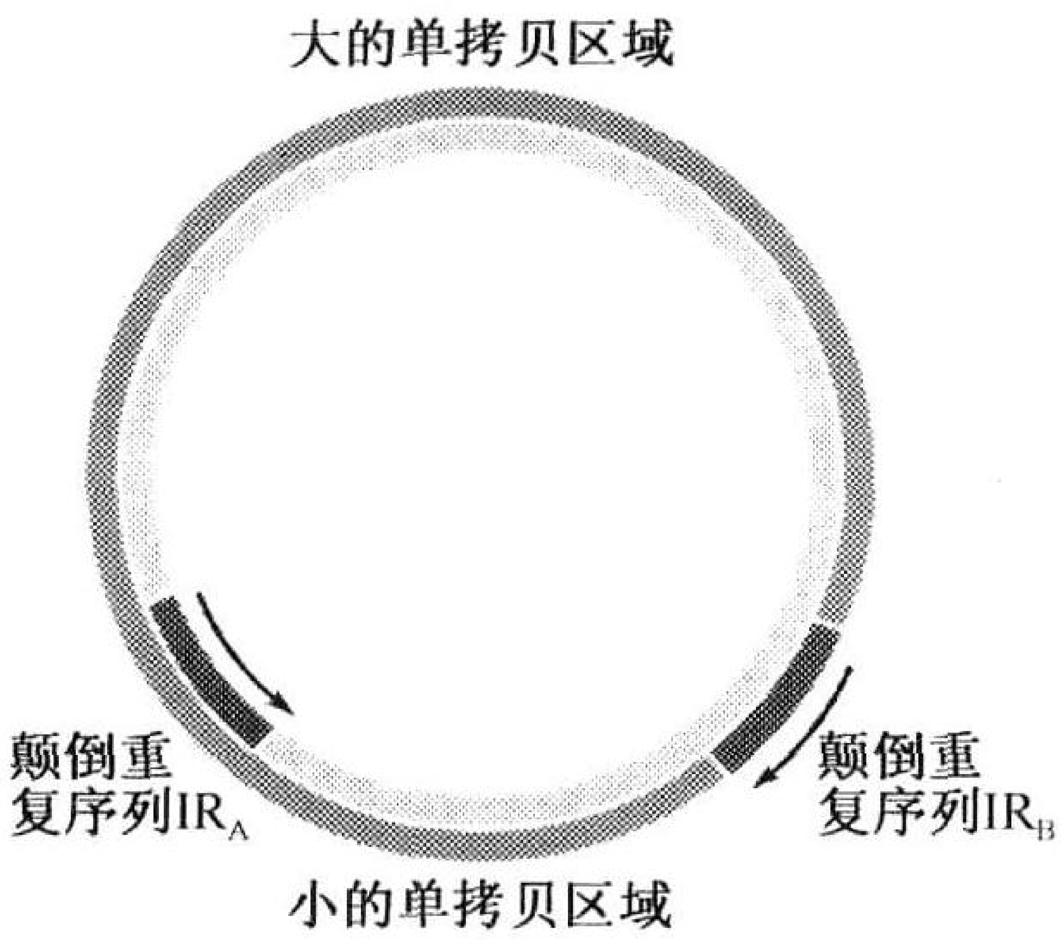


图 15.10　典型的叶绿体基因组。叶绿体的基因组是环状双链 DNA 分子。大多数含有 2 个颠倒重复序列（IR_A 和 IR_B），这就形成了一个小的单拷贝区域（SSC）和一个大的单拷贝区域（LSC）的边界。

叶绿体的基因组

已知叶绿体的基因组都是环状 DNA 分子。然而，尽管每一个叶绿体中有几个拷贝的基因组，但每个基因组都是相同的。典型的叶绿体基因组大小为 120～160kb，包含有 2 个 6～76kb 的颠倒重复序列（图 15.10）。几种生物的叶绿体基因组的序列测定已经完成，在表 15.4 中总结地列出了一些结果。有鞭毛的原生动物——原始绿藻（*Mesostigma viride*）属于最早的绿色植物的分支。它的叶绿体包含的编码蛋白质的基因和 tRNA 基因比现今已知的其他生物都要多，并且有典型的基因组结构，如图 15.10 所示。

表 15.4　一些叶绿体的基因组[a]

生物	大小/bp	基因编码			颠倒重复序列[d]
		蛋白质[b]	tRNA	rRNA[c]	
绿藻（*Chlorella vulgaris*）	150 613	77	31	1	无
原生动物（*Euglena gracilis*）	143 170	67	27	3	无
原生动物（*Mesostigma viride*）	118 360	92	37	2	有
黑松（*Pinus thunbergii*）	119 707	72	32	1	有[e]
水稻（*Oryza sativa*）	134 525	70	30	2	有
玉米（*Zea mays*）	140 387	70	30	2	有

a. 所有的叶绿体基因组是环状、双链 DNA 分子（见 14.4 节）。

b. 这些基因包括编码已知功能蛋白质的基因和可能有功能的 ORF。

c. 每一个单位是一个 rRNA 操纵子，包括编码每一个 rRNA 的基因（见 7.13 节）。

d. 见图 15.10。

e. 尽管存在颠倒重复序列，但它们被大大地截短了。

在叶绿体中，许多编码蛋白质的基因参与光合作用和自养作用。然而，叶绿体的基因组也含有编码组成叶绿体核糖体的 rRNA 和组成翻译元件的 tRNA 的基因，编码一些用于转录和翻译的蛋白质和一些其他蛋白质的基因。一些在叶绿体中发挥功能的蛋白质是由细胞核里的基因编码的，当叶绿体由一个能独立生活进行光合作用的内共生菌进化而来时，假定基因是在那时候被转移到细胞核中的。不像能自主生活的原核生物，叶绿体的基因通常含有内含子，它们主要是通过自我剪接的方式（见 14.8 节）进行编辑。

叶绿体基因组的分析强有力地支持了内共生的假说（见 11.4 节）。例如，叶绿体的基因组包含有一些与大肠杆菌、蓝细菌（*Cyanobacteria*）和一些其他细菌同源的基因。

在这些基因中还包括一些基因，编码参与细胞分裂的蛋白质，这就暗示叶绿体的分裂机制与细菌的很相似。除此之外，在叶绿体中编码膜运输蛋白质的基因与细菌的也有很高的同源性。

线粒体的基因组

在许多真核生物中都含有线粒体，它参与能量的生成。线粒体的基因组主要编码一些参与氧化磷酸化作用的蛋白质。和叶绿体的基因组一样，它也编码一些参与蛋白质合成的基因，如 rRNA、tRNA 和一些翻译蛋白质。然而，线粒体基因组编码的蛋白质比叶绿体少得多。

将近有 200 个线粒体的基因组已经完成了序列测定。最大的线粒体基因组包含有 62 个编码蛋白质的基因，而其他线粒体基因组最小的只编码 3 个蛋白质。几乎所有的动物包括人的线粒体基因组只编码 13 个蛋白质（加上 22 个 tRNA 和 2 个 rRNA），酿酒酵母的线粒体基因组只编码 8 个蛋白质。

然而叶绿体使用的是“通用”遗传密码子，与线粒体使用的简并密码子稍微有点区别（见 7.14 节）。对于小基因组来说，这似乎是由于选择压力造成的。即使考虑使用摆

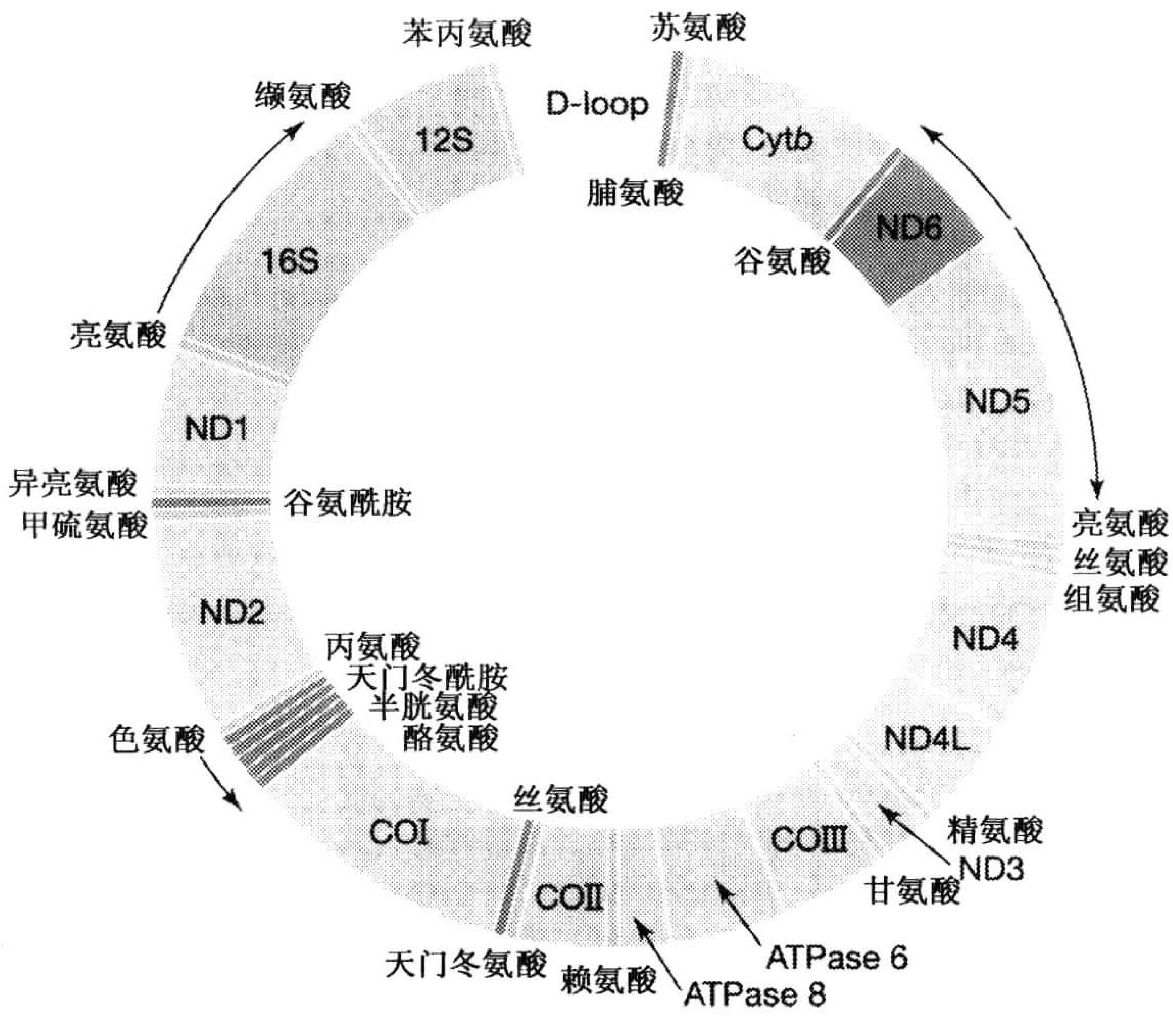


图 15.11　人线粒体的基因组图谱。人线粒体的环状基因组大小为 16 569bp。基因组编码 16S 和 12S rRNA（相当于原核生物的 23S rRNA 和 16S rRNA）和 22 个 tRNA。这些基因用 2 个橙色的阴影表示，深橙色表示图谱中顺时针方向转录的基因，浅橙色表示逆时针方向转录的基因（在图谱外，对应着 tRNA 的氨基酸被用于逆时针方向转录的基因，在图谱内的被用于顺时针方向转录的基因）。13 个编码蛋白质的基因用绿色表示（深绿色表示逆时针方向转录的基因，浅绿色表示顺时针方向转录的基因）。编码蛋白质的基因：Cyt b，细胞色素 b；ND1-6，NADH 脱氢酶复合物的组成成分；COⅠ～COⅢ，细胞色素氧化酶复合物的亚基；ATPase 6 和 ATPase 8，线粒体 ATPase 复合物的多肽。两个启动子位于 D-loop 区（一个参与 DNA 复制的区域）。

动密码子，标准的 22 个线粒体 tRNA 对于阅读所有的遗传密码子还是不够充分。因此，在线粒体中，密码子和反密码子（见 7.43 节）的碱基配对比细胞中的更灵活。

不像叶绿体的基因组，都是单一的环状 DNA 分子，线粒体的基因组在形态上更具有多样性。例如，一些线粒体的基因组是线性的，包括一些藻类、原生动物和真菌的线粒体。另外，如酿酒酵母，尽管遗传和限制酶切图谱显示线粒体的基因组是环状，但体内的主要形式是线状（回顾 9.9 节，细菌噬菌体 T4 基因组遗传上是环状的，但物理形态上是线性的）。图 15.11 显示的是人的大小为 16 569bp 的线粒体基因组（13 个基因）。酵母的线粒体基因组要大些（85 779bp），但是只含有 8 个编码蛋白质的基因。除了编码 RNA 和蛋白质的基因外，酵母线粒体的基因组含有一段很长的富含 AT 的 DNA 区域，但却没有明显的功能。

最后，需要说明的是一些生物的线粒体内存在一些小的质粒，使得线粒体的基因组分析更加复杂。在分析线粒体和叶绿体的基因组时，一个比较复杂的问题是寻找一个编码特殊蛋白质的基因是比较困难的，即使蛋白质的氨基酸序列和细胞器 DNA 的序列都是已知的。这是因为存在着 RNA 编辑（RNA editing）（见知识窗）。

知识窗：RNA 编辑

在第 7 章和第 14 章中，我们看到，一些基因的编码区被一些叫做内含子的非编码区分隔开。一般内含子在转录后就被剪切掉，形成成熟的 mRNA，这个过程被叫做拼接（见 14.8 节）。有趣的是，在细胞器的基因组中，有一种和拼接相反的现象，被称为 RNA 编辑。

RNA 编辑涉及 mRNA 中碱基的插入和缺失，这些不存在于 DNA 的转录过程中。RNA 编辑还包括 mRNA 中碱基的化学修饰，将一个碱基转变成另外一个碱基。RNA 编辑可以用这种方式改变密码子，这样在多肽中就插入了许多不同的氨基酸，比基因本身编码的氨基酸要多。

在锥体虫和一些原生动物的线粒体内（见 14.10 节），一些线粒体的转录产物被编辑，以至于大量的尿苷酸被加入（一些时候达到上百个），或是由于删除而更加稀少，这种 RNA 编辑的例子如图 1 所示。RNA 编辑被一些存在于 mRNA 内的短序列精确地控制，它可以介导一些酶来参与这些特异的编辑。显然，这些过程必须被精确地控制。插入太多或删除导致碱基减少都有可能产生可读框的移位，这样编码的蛋白质有可能没有功能。

在高等植物的叶绿体和线粒体中还普遍存在着另外一种 RNA 编辑，即将一个碱基转变成另外一个碱基。在一些 mRNA 的特异位点，通过氧化去氨基作用，从一个 C 转变成 U（相反的修饰比较少）。在玉米的叶绿体中，至少有 25 个位点的 C 转变成了 U。尽管这种转变大多数是在细胞器的基因组中被发现，但程序化的 C 到 U 的转变的例子在哺乳动物的核基因组内也存在。依赖于这种特定区域的编辑，形成了一种新的密码子，导致了基因编码的蛋白质序列的不可预见性。

尽管 RNA 编辑是个奇怪的现象，但并不是分析细胞器基因组大的障碍。这是因为细胞器基因组编码的蛋白质数目少，并且蛋白质高度保守。相比较而言，RNA 编

辑已经成为了细胞中普遍存在的现象，在不同生物中，基因组的遗传学注释和同源基因的鉴别是至今更大的挑战。

RNA 编辑的功能和起源是未知的。但是，一些科学家指出，这个过程也许是 RNA 世界里与核酶（见 14.8 节）和其他一些催化性 RNA 一起发挥作用的另外一种机制（见 11.2 节）。

蛋白质	...Leu Cys Phe Trp Phe Arg Phe Phe Cys...
mRNA	...uuG uGu UUU UGG uuu AGG uuu uuu uGu...
DNA	... G G TTT TCC AGG G ...
	... C C AAA AGG TCC C ...

图 1　RNA 编辑。上面的图显示的是来源于原生动物布氏锥虫（*Trypanosoma bruei*）（见 14.10 节）的细胞色素氧化酶Ⅲ亚基的氨基酸序列的一部分。这个蛋白质由线粒体编码。在氨基酸序列的下面，显示的是对应的 mRNA 的序列。序列中，大写字母是由下面的基因转录得到。小写字母是通过 RNA 编辑插入的碱基。尽管这段 DNA 有许多信息上的间隙，但实际分子是没有间隙的。碱基间的空隙只是为了方便观察。

细胞器和核基因组

叶绿体和线粒体所需要的蛋白质比它们编码的还要多。例如，参与细胞器蛋白质翻译的蛋白质比细胞器本身编码的还要多。因此，许多细胞器的功能都是由核基因调控的。

据估计，酵母的线粒体含有大概 400 个不同的蛋白质，只有 8 个蛋白质是由酵母的线粒体编码。因此，酵母线粒体所需要的蛋白质几乎都是由核基因编码的。虽然在真核生物的细胞核/细胞质中发挥的特殊功能的基因和蛋白质应该在细胞器中发挥同样的功能，这句话似乎有一定的道理，但这并不是事实。尽管编码许多细胞器蛋白质的基因存在于细胞核中，在细胞质中进行转录和翻译，但基因产物必须运输到细胞器中才能行使特殊的功能。

最先研究的线粒体蛋白质是参与翻译的蛋白质，很明显的是这些核基因编码的线粒体蛋白质与细菌的蛋白质有很近的同源关系，和真核生物的蛋白质不是很相近。因此，首先很明显的是，大部分编码线粒体蛋白质的基因是从线粒体中转移到细胞核里。然而，因为缺少一定的遗传学方法，很难对这个问题进行进一步的分析。

分析这个问题需要有一种真核生物的基因组序列，一种系统发生与线粒体基因组很相近的原核生物的基因组序列，并且与其他细菌的基因组序列进行比较。真核生物的线粒体基因组的信息不是必需的（因为它编码很少的蛋白质），但是需要有在线粒体中行使功能的蛋白质的信息。所有这些信息在酿酒酵母可以得到，并且进行了分析。

令人奇怪的是，400 个编码线粒体蛋白质的核基因，只有 50 个基因与系统发生来源和线粒体相近的原核生物的基因具有同源性［α-变形菌纲（α-proteobacteria），见 12.1 节］。另外 150 个与细菌的蛋白质比较相近，但不属于 α-变形菌纲。然而，编码剩余 200 个蛋白质的基因与细菌的已知基因没有同源性。大部分类似细菌的蛋白质参与能量转化、翻译和合成，然而其他蛋白质大部分参与膜调控和运输。因此，尽管有许多证

据表明线粒体来源于内共生菌，但基因组分析表明它的遗传学历史比以前认为的要复杂得多。

概念检查

叶绿体和线粒体有独立于核基因组外的小的基因组。这些基因组编码 rRNA、tRNA 和一些参与能量代谢的蛋白质。尽管细胞器的基因组独立于核基因组之外，但细胞器不能独立于细胞核而存在。许多细胞核中的基因编码细胞器的功能蛋白质。这些基因有不同的系统发生历史。

- ◆ 酵母和人的线粒体基因组的大小和含量有怎样的相关性？
- ◆ 在酵母中，编码线粒体功能蛋白质的基因有什么不同？
- ◆ 什么是 RNA 编辑？它与 RNA 剪接有什么不同？

15.8 进化和基因家族

最先进行的基因组学研究是确定一个生物所含基因的数目、序列和功能。然而，基因组学不只是测序和基因注释，还应该解释生物如何和环境相互作用。比较基因组学就能帮助我们了解生物之间的进化关系。根据基因组序列重新构建的进化关系与根据生物特征建立的简单关系不同，并且能够解决系统发生树中根据单个基因分析（如 16S rRNA，见 11.5 节和 14.9 节）引起的不确定性。这些知识能够帮助我们了解早期的生命形式，同时回答生物学中最基本的问题：生物如何起源？

基因复制和基因家族：种内同源基因和直向同源基因

原核生物和真核生物的基因组中都含有基因家族（gene family）——在一种生物中一些基因和另外一些基因是相关的。尽管在大的基因组中不是惯例，但比较基因组学显示出许多基因是因为其他基因复制而产生的。这些基因被称为种内同源基因（paralog），这些基因是因为一种生物在进化到某一时间进行基因复制时而导致其基因相似性。一种生物的基因与另外一种生物的基因相近，但基因的物种形成不同，被称为直向同源基因（ortholog）。种内同源基因一个很好的例子是人的编码乳酸脱氢酶（LDH）同工酶的基因。这些酶在结构上截然不同，但高度相关，并且执行相同的酶学反应。相比较而言，LDH 的直向同源基因是指细菌的 LDH 和人的 LDH 同工酶。

基因和基因家族的研究是比较基因组学的主要任务。因为许多种不同生物的染色体测序已经完成，因此比较基因组很容易做，而且结果经常令人感到惊奇。例如，古生菌中参与 DNA 复制、转录和翻译的基因与细菌和真菌相比，它和真菌更相近。利用生物信息学这强有力的分析工具可以快速地在单个基因，一组基因，或整个基因组水平推算出不同生物之间的遗传学关系。获得的结果为仅通过比较核糖体 RNA 序列（见 11.5 节）推算得到的系统发生图提供了更进一步的支持，并且暗示所有生物的许多基因有着共同进化的根。同时，这种分析也揭示出了基因间的水平流动，这是我们下面转而讨论的非常重要的问题。

水平基因转移

进化的前提是将遗传性状从一代传给下一代。然而，也会发生基因的水平转移，它将进化研究复杂化，尤其是整个基因组的研究。水平基因转移（horizontal gene transfer）发生在当基因从一个细胞转移到另外一个细胞的时候，也通常发生在从母本传给子代的遗传过程中。在原核生物中，至少存在 3 种已知的基因水平转移的方式：转化（transformation）、转染（transduction）和结合（conjugation）（见第 10 章）。

在自然界中，基因的水平转移广泛存在，是一个甚至可以横跨区域的过程。然而通过比较基因组学可以发现，不同生物之间的区别还是比较大的。例如，在衣原体（*Chlamydia*）（见 15.3 节和 26.13 节）和立克次氏体属（*Rickettsia*）（见 12.13 节和 27.3 节）中发现了几个有真核生物起源的基因，这两个都是人的致病菌。此外，遗传学分析表明，海栖热袍菌有 400 个基因（超过其基因组的 20%）来源于古生菌。在这些基因中，有 81 个在离散的群中。这强有力地证明它们是通过基因的水平转移获得——大概来源于与海栖热袍菌一样能够生活在高温环境中的嗜热古生菌。

在基因组中，一旦基因被注释了，就能够发现基因水平转移的存在。一些编码蛋白质的基因在亲缘关系较远的物种中被发现，这就是这些基因来源于水平转移的一个信号。然而，另外一个表明基因是水平转移来的线索是一个 ORF 或 ORF 的 GC 含量（见 11.10 节）或密码子的偏爱性与基因组中剩余的部分有很大的不同。用这些线索，在不同原核生物的基因组中，许多可能是基因水平转移的例子得到了证明。发生水平转移的基因一般是编码行使代谢功能，包括 DNA 复制，转录和翻译这些核心的分子过程的蛋白质，这就说明了前面章节提到的古生菌和细菌的代谢基因为什么具有相似性。此外，还有几个例子表明，一些病原体的致病基因（见 21.8 节和 21.9 节）也是通过水平转移获得的。显然，在自然界中，原核生物一直在进行着基因的交换，这个过程就像是个精确的调控，使一个生物的基因组去适应一个特殊的环境。

砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）的基因组揭示出一些发生水平转移的基因可能来源于真核生物，甚至可能来自于人这个宿主。这种情况与真核生物细胞核里的基因可能是从线粒体的祖先（见 15.7 节）转移过来的说法完全相反。如果，这些砂眼衣原体的基因确实来源于人，那就表明基因的水平转移并不局限于真核生物和原核生物的界限。

基因组的进化分析也包括实验部分。鉴别原核生物的基因，尤其是病原菌特征基因的能力，已经促进了临床药物的研究，用于研发一些针对这些基因产物的强有力的特异的诊断工具和治疗药物。

概念检查

基因组学可以用来研究一个生物的进化历史。生物的基因组中包含有基因家族，这些基因的序列是相关的。如果是由于基因复制引起的，这些基因被称为种内同源基因（paralog）；如果是由于物种形成引起的，被称为直向同源基因（ortholog）。生物可以通过一个被称为水平基因转移的过程从它们生活环境中的另外一个生物获得基因。

◆ 比较 paralog 基因和 ortholog 基因。

◆ 描述一个发生在原核生物中的水平基因转移过程。

15.9 基因组“采掘”

就像我们所讨论的，基因组的分析为我们提供了一种生物的遗传蓝图。通过遗传分析，我们可以获得有关一个生物代谢和生态的很多有价值的知识。然而，基因组分析显示，与一个已知的途径或过程相关的一个或更多的基因通常是缺失的。这也许意味着，这个生物在用一种新的途径或者至少涉及一个新的反应。在这种情况下，感兴趣的就是寻找这个基因，它所编码的蛋白质能够行使这个缺失的功能。这个工作可以通过计算机轻易地完成。通过在含有一种生物完整基因组序列的数据库中去寻找这样一个新的基因被称为基因组“采掘”（genomic mining）。寻找集胞蓝细菌（*Synechocystis*）的 DNA 聚合酶就是一个很好的例子（图 15.12）。

集胞蓝细菌的 DNA 聚合酶：内含肽和基因组采掘的成果

所有的细菌都包含有一个类似于大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅲ的 DNA 聚合酶，这是 DNA 复制时使用的主要聚合酶（见 7.6 节）。这是一个酶的复合物，包含有许多不同的亚基，催化聚合酶反应的亚基是 DnaE，它是 *dnaE* 基因的产物。因为 DNA 聚合酶是高度保守的蛋白质，并且在所有细胞中是至关重要的，所以在任何一种细菌的基因组中都能很快地寻找到一个和大肠杆菌的 *dnaE* 基因序列相似的基因（一个直向同源物基因）。然而有趣的是，在集胞蓝细菌的基因组中（表 15.1）并没有找到这样一个基因。取而代之的是，我们找到了两个未知功能的 ORF，如果把它们合并起来，会形成一个和 *dnaE* 基因高度同源的基因。这两个 ORF 在集胞蓝细菌的基因组上相隔大概 700bp，并且位于两条相反的 DNA 链上，表明它们是按相反的方向进行转录。这两个 ORF 是 *dnaE* 基因的一部分吗？

仔细地对这 2 个 ORF 进行序列分析后发现这的确如此。这个基因编码一个内含肽（intein）中 2 个互补的部分，它是一个能够发生自我剪切的蛋白质（见 8.3 节）。集胞蓝细菌的这 2 个 ORF 被克隆出来。内含肽被转录和翻译后，能够自我催化 DnaE 两个部分的剪切、拼接反应，形成完整的有催化活性的 DnaE 蛋白（图 15.12）。

为什么集胞蓝细菌以这种分离的方式分布它的 *dnaE* 基因？现在这个问题还是未知的，但是进化告诉我们，无论是什么原因，这都是这个特殊生物表达基因最理想的方式。在这方面，集胞蓝细菌并不是唯一的一种生物。一些古生菌中有关 DNA 复制的基因也包含有内含肽，包括骑火球纳米古生菌（*Nanoarchaeum equitans*），一种基因组很小的寄生古生菌（表 15.1）。很难想像，没有扫描和比较整个基因组的能力，如何发现这种与众不同的生物机制，而这些方法现今都已经变得较为常规了。在基因组“采掘”中，还会发现很多惊奇的现象，同时也会带来很多具有应用前景的发现。

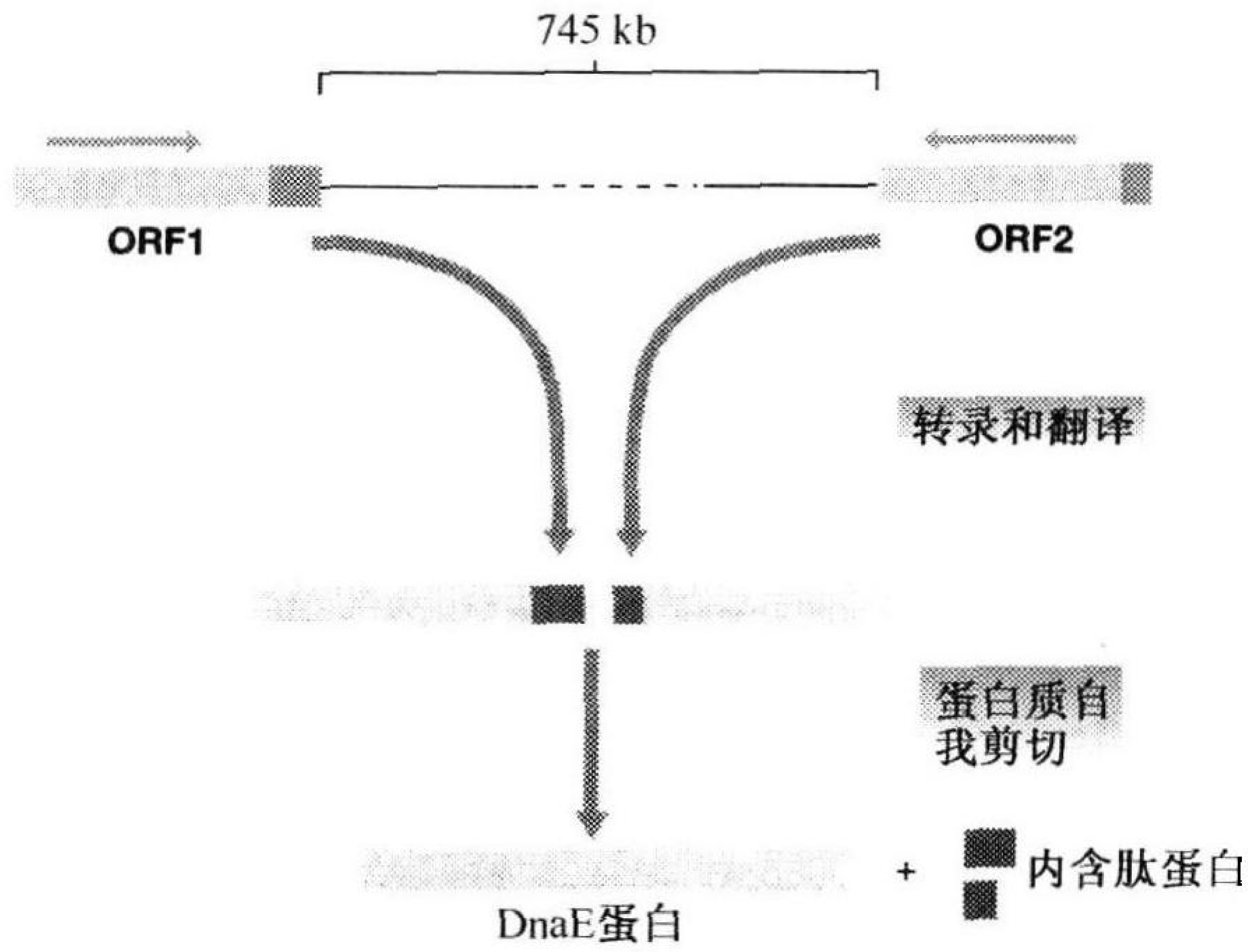


图 15.12　内含肽：集胞蓝细菌中分离的 *dnaE* 基因。两个 ORF 如图中橙色的箭头所示，以相反的方向转录。这两个 ORF 的蛋白质产物每一个都含有内含肽蛋白的一部分（ORF 2 的蛋白质产物已经画出从氨基端到羧基端的方向）。几个来自于古生菌的 DNA 复制酶也有内含肽蛋白，所以这种现象不只局限于细菌。

概念检查

一般有必要在基因组的数据库中去仔细地寻找一个特殊的基因，这个过程被称为基因组“采掘”。一般可以通过这种方法寻找一个新的基因或者寻找那些通过预测发现必然存在的基因。

◆ 怎样区别内含肽和能够自我剪切的内含子？

Ⅳ 基因功能和调控

15.10 蛋白质组学

基因组研究的另外一个目的是确定哪些基因被表达成蛋白质，并且测定这些基因产物的功能。蛋白质组（proteome）这个词是指在任一时间，细胞内存在的所有的蛋白质。值得注意的是，蛋白质组并不简单地指一个生物基因组所编码的所有的蛋白质。尽管一种生物的基因是一直存在的，但基因表达是被调控的（见第 8 章）。细胞中蛋白质的数目和种类会随着生物所处的环境和其他因素而发生改变，如发育周期。在基因组范围内，研究一种生物的蛋白质结构，功能和调控被称为蛋白质组学（proteomics）或功能基因组学（functional genomics）。

二维凝胶电泳

在蛋白质组学研究中，一种已经被广泛应用的方法是二维聚丙烯酰胺凝胶电泳

(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)。这种技术能够分离、鉴定和测量一个细胞样品中所有的蛋白质。在图 15.13 中显示的是用二维（2-D）凝胶分离来自于大肠杆菌中的蛋白质。在一维（图中的水平方向），蛋白质通过等电点（isoelectric point）不同被分离开，这是指在一定的 pH 下，蛋白质所带的净电荷为零。二维方向，蛋白质中每一个氨基酸被带上了一定的电荷而发生变性。蛋白质根据大小不同而被分离开（与根据大小不同分离 DNA 的方法相同，图 7.22）。

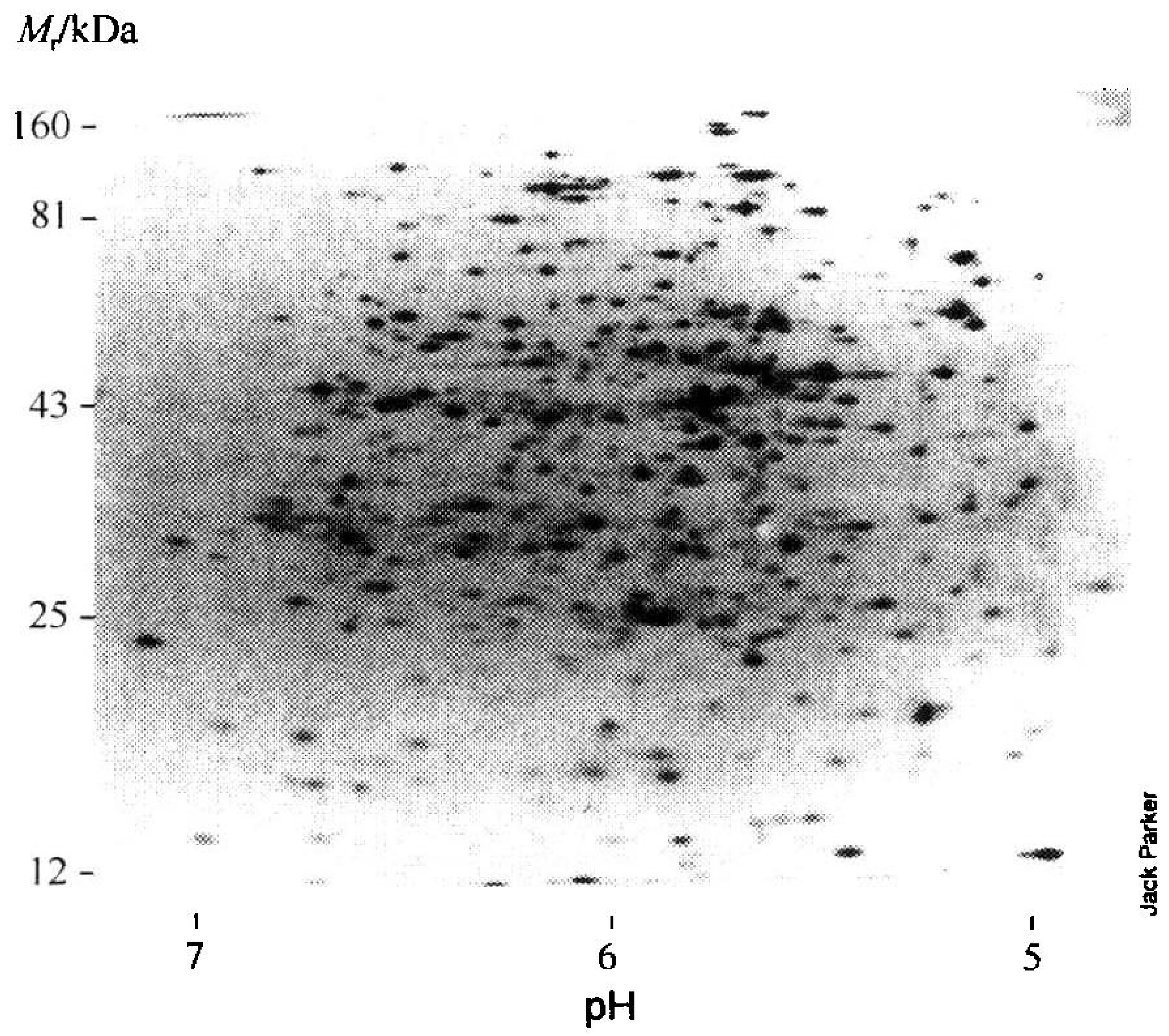


图 15.13 蛋白质组学：蛋白质二维聚丙烯酰胺凝胶电泳。图中是利用放射自显影技术显示的大肠杆菌培养物的蛋白质。胶上每一个点是一个特殊的蛋白质。蛋白质通过培养时加入放射性的甲硫氨酸被标记上，便于观察和定量。蛋白质在变性条件下通过等电点聚焦第一次被分离出来，pH 范围集中在 5～7，在这个范围内，可以找到大肠杆菌的大部分的蛋白质（分离的蛋白质中没有核糖体的蛋白质）。二维电泳通过分子质量大小的不同（M_r 单位 kDa），分离这些变性的蛋白质，最大的蛋白质在胶的最顶端。

以大肠杆菌和其他的一些生物为例，已经通过生化和遗传学的方法鉴定了用二维电泳分离出的上百种蛋白质，也研究了它们在不同环境下的表达调控。在二维胶中，根据一个特殊的蛋白质在不同的生长环境下的出现和消失，可以用来评定不同环境条件下的蛋白质组。利用二维凝胶系统将一个未知蛋白质与一个特殊的基因联系起来的方法是将蛋白质从胶中提取出来，对蛋白质的 N 端进行序列测定。序列信息足以用来设计寡核苷酸引物，然后利用聚合酶链反应（见 7.9 节）从基因组的文库中扩增出编码这个蛋白质的基因。接着利用测序和比较基因组学，有可能推测出这个基因的功能。

功能和结构基因组学

尽管蛋白质组学经常需要比较精细的实验（图 15.13），但计算机技术也是非常有用的。在获得一种生物基因组的全序列后，最开始进行的分析是将序列和其他生物的序列进行比较，去定位和鉴定那些与已知基因相似的基因。这里最重要的序列指的是蛋白质氨基酸的序列。因为遗传密码子的简并性（见 7.14 节），DNA 序列的不同不一定导

致氨基酸序列的不同（图 15.14）。



图 15.14　核苷酸序列和氨基酸序列同源性的比较。 3 组不同的核苷酸序列被显示（显示的是 RNA 序列）。序列 2、序列 3 和序列 1 只有 3 个位置的核苷酸不同。然而，序列 1 和序列 2 编码的氨基酸序列是相同的，而序列 3 编码的氨基酸序列和其他 2 个没有相关性。

序列同源性超过 50％的蛋白质一般具有相似的功能。序列同源性超过 70％的蛋白质几乎肯定具有相似的功能。获悉一个蛋白质可能功能的重要线索是鉴定蛋白质序列的某个区域，该区域是否存在于其他蛋白质内部并且是一个已知功能蛋白质的某个区域。后者一般指一些区域，如金属结合区域、核苷酸结合区域，或者是一些协同作用因子的结合区域。例如，一个带有 NAD^+ 结合区的蛋白质，是一个肯定参与氧化还原反应的蛋白质（见 5.7 节）。

特殊的蛋白质区域有特殊的序列，使它们具有功能的是它们的三级结构（见 3.8 节）。结构基因组学（structural genomics）是测定一种生物的有功能蛋白质中有代表性蛋白质的三维结构。最终目的是建立一个蛋白质结构信息库，能够根据这些信息利用计算机技术从蛋白质的一级结构去预测任意一个蛋白质可能的结构和功能。尽管这个目标现在还没变成现实，但随着越来越多的蛋白质序列被测定出和被分析，这个时期即将到来。基因组学和蛋白质组学的联系会更加紧密。

基因组学和蛋白质组学正在为不同生物在环境的刺激下，基因如何表达提供重要线索。这些信息不仅具有重要的基础科学理论价值，也具有潜在的应用价值。这些为医药、环境和农业生产带来了进步。在这些领域，了解基因组和蛋白质组的联系和它们如何被调控，将使人们能够更好地控制许多重要的领域，如疾病、人口和农业生产力。

概念检查

蛋白质组包括一种生物在任一时间内的所有蛋白质。蛋白质组学的目的是研究这些蛋白质，去了解它们的结构、功能和调控。

◆ 一种生物能含有不止一个蛋白质组吗？

◆ 什么是结构基因组学？

15.11 微阵列和转录物组

蛋白质组学的一个主要目的是研究基因表达。但是还有其他的途径去研究这个过程。基因表达经常是在转录水平被调控的（见第 8 章）。一个基因被表达，它必须首先被转录。知道在哪种情况下基因被转录可以提供有关基因功能的信息。与蛋白质组类似，在特定的环境下产生的所有的 mRNA 被称为转录物组（transcriptome）。分析转录物组的一种强有力的工具是微阵列（microarray）技术。

微阵列和 DNA 硅芯片

在第 7 章中，我们讨论了如何利用核酸杂交技术将基因定位到 DNA 特定的区段中（见 7.7 节）。根据基因组序列信息，可以通过 mRNA 和特异 DNA 片段的杂交技术测定基因的表达。这种技术已经发展成为微阵列或基因芯片（gene chip）技术。

微阵列是在一些小的固体支撑物上，将代表一种生物所有的基因或基因的一部分通过已知的阵列形式黏附在上面（图 15.16a）。基因是通过 PCR 合成的，或是根据基因组的序列设计合成每一个基因的一段寡核苷酸序列。一旦被黏附在固体支撑物上，这些基因（或基因片段）能够与特殊环境下生长的细胞的 mRNA 进行杂交，然后通过计算机进行扫描和分析。芯片上的 DNA 和特异的 mRNA 能够杂交，证明了这个基因的表达。

一种制作和运用微阵列的方法如图 15.15 所示。用制作计算机芯片（影印法）的方法制作 1～2cm 的硅芯片，每一个芯片能够容纳上千个不同的 DNA 片段（图 15.15 和图 15.16）。例如，由一个公司研制并进入市场的人类基因组芯片，它包含有人类所有的基因组（图 15.16a）。这个芯片可以分析 47 000 个转录本，此外还有一个有 6500 个寡核苷酸的小室，用于临床药学的研究。图 15.16b 显示的是一个芯片的一部分，该芯

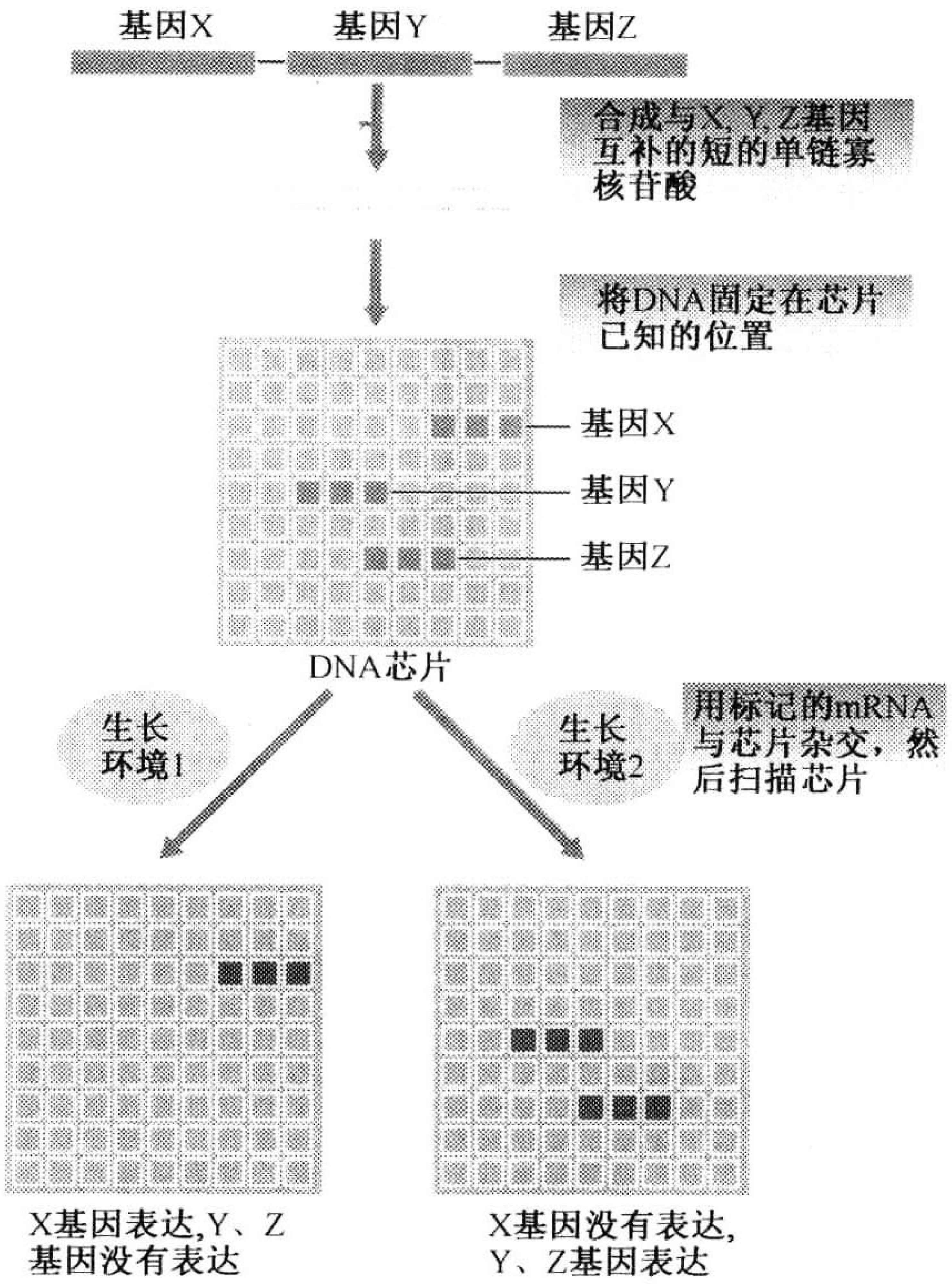


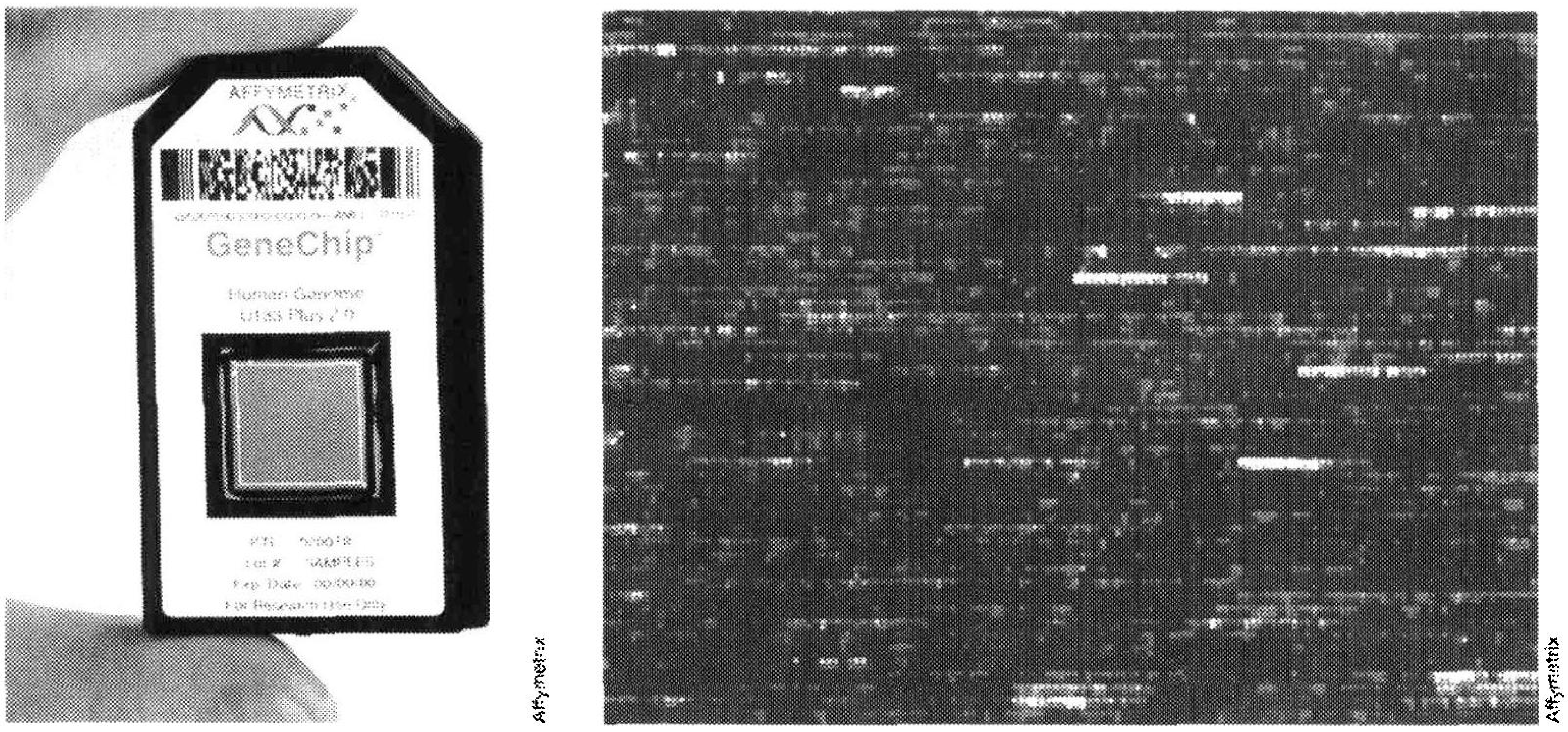
图 15.15 转录物组的测定：制作和利用 DNA 芯片。单独合成对应着一种生物所有基因的短单链寡核苷酸（见 7.8 节），然后固定在芯片已知的位置上，形成一个 DNA 芯片（微阵列）。提取在特定环境下生长细胞的 mRNA，标记上荧光染料，与芯片进行杂交。然后，用激光荧光探测器扫描芯片。

片用于分析酿酒酵母基因组的表达。

图 15.16b 显示的基因芯片轻易地容纳下酿酒酵母 5600 个编码蛋白质的基因，因此这个生物所有的基因的表达可以通过一个实验进行检测。为了做这个实验，提取在特定环境下生长的酵母细胞的 mRNA 与芯片进行杂交，然后标记上荧光染料。只有和芯片上的 DNA 序列互补的 mRNA 才能结合上去。为了检测杂交，用激光荧光探测器扫描芯片，然后用计算机分析杂交信号。一个清楚的杂交结果模式图被检测到，它显示的是芯片上哪些 DNA 与 mRNA 进行了杂交（图 15.15 和图 15.16b）。尽管杂交显示的是一个基因是否表达，是质的结果，但结合量的强度也显示出一个基因表达量的多少（图 15.16b）。完成杂交和激光检测后，计算机会列出一个表格，说明哪些基因进行了表达，并且表达的程度如何？因此利用基因组芯片，人们可以了解一种生物在特定的人们感兴趣的生长环境下，基因的瞬时转录。

基因芯片的利用：基因表达

利用基因芯片，根据固定在芯片上的基因，人们可以解决一些一般或特殊的科学问题。例如，可以利用所有的 mRNA 作为探针，检测一种生物所有的基因的表达（图 15.16b）。同时，人们也可以比较在不同的环境下，不同基因的表达，单独的或成批的。同时能够在质和量方面快速地分析上千个基因的表达，对弄清代谢和调控的复杂性有巨大的促进作用。这个技术可以针对像原核生物一样简单的生物，只有 400～800 个或更多的基因（表 15.1），同样也可以适用于像人一样复杂的生物，有将近 30 000 不同的基因。



(a)　　(b)

图 15.16　转录物组的测定：DNA 芯片在基因表达中的应用。（a）人的基因组芯片。芯片上有 40 000个基因片段。（b）杂交芯片。照片显示的是硅芯片上的一部分，固定着酿酒酵母基因组的 1/4。每个基因存在几个拷贝，与特定环境下荧光标记的酵母细胞的 mRNA 进行杂交。芯片的背景是蓝色。RNA 和 DNA 杂交的地方被颜色不同的深浅梯度显示出来，最大的杂交强度显示的是白色。因为不同的基因在芯片上的位置是已知的，一旦芯片被扫描，结果就能显示出哪些特异基因得到了表达。

例如，酿酒酵母的基因芯片（图 15.16b）被用于详细地研究包括发酵和呼吸作用的酵母生长和代谢调控。用转录物组进行分析，可以观察到当酵母细胞从发酵状态（缺氧）转变到呼吸作用的代谢状态时，哪些基因关闭，哪些基因开启。用这个实验进行基因表达的转录物组分析显示，当酵母细胞转变到有氧生长的过程时，主要经历了一个代谢重调的过程。在这个转变过程中，一系列控制乙醇（一个关键的发酵产物）产生的基因表达被强烈地抑制，而参与柠檬酸循环功能（有氧生长需要的）的基因被强烈地激活。在这个代谢的转变过程中，大概总共有 700 个基因被开启，1000 个基因被关闭。此外，利用微阵列技术，在发酵和呼吸作用的转变过程中，可以监测到酵母几个未知功能基因的表达，这为了解这些基因可能具有的功能提供了一些线索。目前，还没有其他的方法像微阵列技术一样，能够提供有关基因表达的如此多的信息。很显然，微阵列技术为在基因组水平上研究基因的表达提供了强有力的工具。

在鉴定中的运用

基因芯片除了用于检测基因的表达，还可以用于鉴定微生物。例如，利用特殊生物的基因组 DNA 片段作为探针，根据它们与芯片杂交结果的不同来区分一些亲缘关系相近的菌株。这可以使人们能够从临床样品中快速地鉴定出致病病毒或细菌，或者是从不同的物质，如食品中检测特殊微生物的存在。这样的芯片已经被用于食品工业中检测特殊的致病菌，如大肠杆菌 O157：H7（见 29.8 节）。

DNA 芯片也可以用来鉴定大的生物。一种商业化的芯片被称为 FoodExpert-ID，含有来自于许多种脊椎动物的 88 000 个基因片段，这种芯片被用于食品工业以确保食品的纯度。例如，芯片可以确认食品标签上标明的肉的种类，还可以检测一些食物产品，其标签上标明动物肉类作为食品的补充或替代物。检测的最终目的是使每一种肉类产品都有一个鉴定卡片，上面标明所能检测到的所有的动物组织。这使消费者对食品的卫生健康问题更有信心。FoodExpert-ID 也可以用来检测在动物饲料中是否存在脊椎动物的副产品，这是因为朊病毒蛋白引起的疯牛病日益引起人们的关注（见 9.14 节和 29.11 节）。

在环境基因组上的应用

DNA 芯片技术在鉴定和评估环境中微生物的活动是非常有用的，这是微生物生态学家的一个重要目标（见第 19 章）。事实上，在微生物生态学领域，已经开启了一个被称为环境基因组学（environmental genomics）的全新领域（见 18.6 节）。因为基因组鸟枪法测序和基因表达芯片技术的建立，现在完全有能力针对一个环境中存在的所有微生物基因组进行测序。例如，土壤和湖水的样品，鉴定环境中微生物的基因表达情况。这些生物群的基因组，被称为宏基因组（metagenome），是指一个生态系统的遗传潜能。所以，可以利用微阵列技术，研究这些自然界中微生物群体的基因表达情况。这些技术帮助微生物的生态学家提出一些新的、更加复杂的问题，有关微生物生态系统如何发挥功能，以及测定微生物群体中特殊的物种对整个生态系统活动的贡献。在 18.6 节中我们把环境基因组学和一些特殊的技术实例放在一起讨论。

概念检查

微阵列是将基因和基因片段以已知的方式黏附在固体支撑物上。这种芯片可以与mRNA进行杂交以分析基因的表达。芯片足够大和密集，可以用来分析整个基因组的转录产物（转录物组）。

◆ 研究一个特殊酶的基因表达，基因芯片能告诉你什么样的结果？

◆ 获悉在特殊环境下整个基因组如何表达，为什么会比较有用？

复习题

1. 仅通过观察，就可以检测到基因是否克隆到 M13 噬菌体中，是什么意思？（见 15.1 节）
2. 从以下几个方面比较 BAC 和 YAC：大小、复制特点、所能容纳的 DNA 的大小。（见 15.1 节）
3. 描述一下，当测序是随机的时候，鸟枪法测序如何能够完成一种微生物完整基因组的序列测定？（见 15.2 节）
4. 基因组注释是什么意思？如何完成？注释和组装有什么不同？哪个过程先发生？（见 15.3 节）
5. 表 15.1 中的生物是按染色体逐渐增大排列的。基因组的大小和 ORF 的含量有什么关系？（见 15.4 节）
6. 你的基因组比骑火球纳米古生菌的大多少？你比骑火球纳米古生菌多多少个基因？（见 15.4 节和 15.6 节）
7. 作为整个基因组的一部分，在基因组小的生物中，哪种基因占有优势？在基因组大的生物中又如何呢？（见 15.5 节）
8. 在细菌和古生菌中，ORF 和基因是相同的意思。然而，严格地说，在真核生物中就不是了。请解释一下。（见 15.6 节）
9. 叶绿体和线粒体，谁的基因组大些？描述一下叶绿体和线粒体基因组的各一个不同寻常的特征。（见 15.7 节）
10. 大肠杆菌的编码 RNA 聚合酶 β 亚基的基因是芽孢杆菌 *rpoB* 基因的直向同源基因。这两个基因是什么关系？你认为芽孢杆菌的 *rpoB* 基因编码什么蛋白质？大肠杆菌的编码不同 sigma 因子（表 8.2）的基因是种内同源基因。这些基因是什么关系？（见 15.8 节）
11. 解释一下如何在基因组中检测到水平基因的转移。（见 15.8 节）
12. 内含肽蛋白是什么？内含肽蛋白是怎么被发现的？（见 15.9 节）
13. 二维凝胶能显示什么？如何将凝胶的电泳结果和蛋白质功能结合起来？（见 15.10 节）
14. 区别基因组、基因组学、蛋白质组、蛋白质组学和转录物组这几个单词。（见 15.11 节）

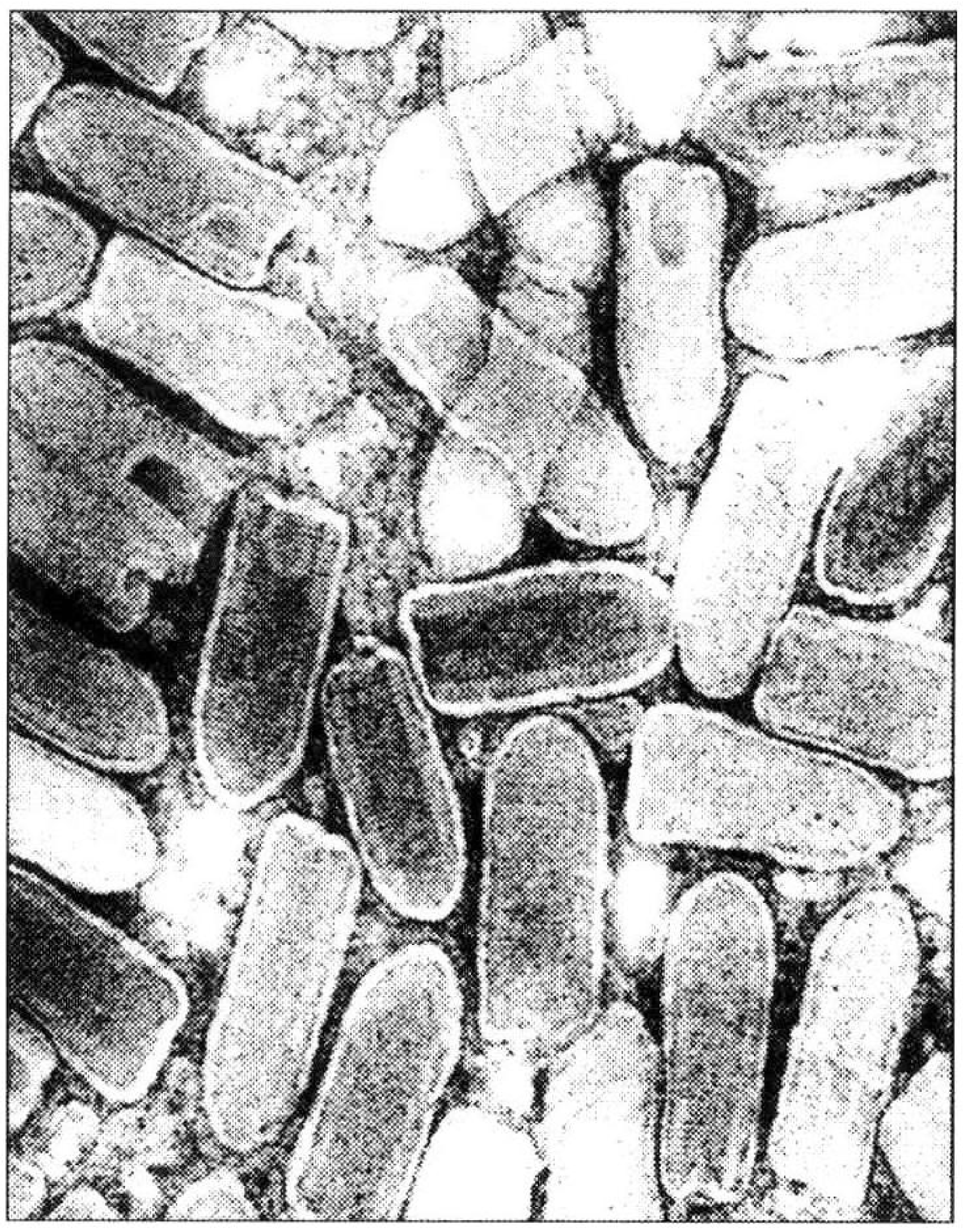
应用题

1. 在进行鸟枪法测序时，在序列中有可能存在间隙。描述一下，如何填补这些间隙，完成整个基因组的序列测定。
2. 酵母的核基因组序列已经公布，但完整的序列还没有完成。酵母的线粒体基因组也很难测定。描述一下，这两种情况下，测序中所遇到的实际困难。
3. 描述一下，当细菌从基本培养基（只含有一种碳源）转移到丰富培养基（含有大量的氨基酸、碱基和维生素）进行培养时，如何测定大肠杆菌哪些蛋白质的表达受到抑制（见 8.5 节）？描述一下，如何研究在每种生长环境下，哪些基因得到了表达？

（潘 皎 译，魏东盛 校）

16

病毒的多样性



病毒能够感染从原核生物到人的所有有机体。已知病毒采用许多不同的复制策略，病毒依据这些基本复制方式进行分类。

词汇表

噬菌体（bacteriophage）：感染细菌的病毒

多联体（concatemer）：两个或多个相同线性核酸分子串联

有囊膜（enveloped）：病毒学中指病毒含有脂蛋白膜包裹病毒颗粒

嗜肝 DNA 病毒（hepadnavirus）：病毒的 DNA 基因组通过 RNA 中间体复制

负链核酸（minus/negative-strand nucleic acid）：与病毒 mRNA 反义的 RNA 或 DNA 链

核衣壳（nucleocapsid）：病毒颗粒中包装完的核酸与蛋白质的完全复合体

重叠基因（overlapping gene）：两个或多个基因，其中一个基因的部分或全部是镶嵌在另一个基因中的

正链核酸（plus/positive-strand nucleic acid）：与病毒 mRNA 同义的 RNA 或 DNA 链

多聚蛋白（polyprotein）：脊髓灰质炎病毒中，一个大蛋白质产生后随之被切割成一些单独的蛋白质

复制型（replication form）：单链 DNA 病毒中作为复制中间产物的双链 DNA

反转录病毒（retrovirus）：复制周期中有 DNA 中间产物、以 RNA 为基因组的病毒

反转录（reverse transcription）：从 RNA 到 DNA 复制遗传信息的过程

RNA 复制酶（RNA replicase）：以 RNA 为模板产生 RNA 的酶

滚环复制（rolling circle replication）：噬菌体 ΦX174 中，以完整环链作为模板，不断替代 5′端延长 3′端的 DNA 复制

转座酶（transposase）：催化将一段 DNA 插入另一段 DNA 的酶

病毒粒子（virion）：细胞外的完整病毒颗粒，核酸被蛋白衣壳或其他材料包裹

病毒（virus）：含有 RNA 或 DNA 的遗传元件，在细胞内复制但含有细胞外形式

在本单元的前几章已涉及微生物的多样性：细菌（*Bacteria*）、古生菌（*Archaea*）和真核生物（*Eukarya*）。这里将集中讨论病毒的多样性及其基因组。关于病毒的本章将涵盖各种病毒，是介绍病毒基本原理的第 9 章内容的扩展。

所有的细胞以双链 DNA 作为基因组。与之不同，已知的病毒分别以单链 RNA、双链 RNA、单链 DNA 及双链 DNA 作为它们的遗传物质，因而其复制和基因表达多样而有趣，正如我们下面将要看到的。本章将通过这些病毒群的复制过程说明病毒的多样性。然而，由于原核和真核两种类型的细胞对于感染它们的病毒生活周期的限制作用各异，因此本章将分别讨论感染原核生物和真核生物的病毒。

Ⅰ 原核生物病毒

目前已知，可以感染细菌的病毒有很多，可以感染古生菌的病毒数量也越来越多。在第 9 章我们提到过，目前了解最多的细菌病毒含有双链 DNA 基因组（见 9.8 节）。然而，还有很多噬菌体（bacteriophage）具有其他类型的基因组。最简单的一类是基因组为 RNA 的 RNA 噬菌体，我们从此开始介绍。

16.1 RNA 噬菌体

许多噬菌体含有正链构型的基因组，这些病毒中的单链 RNA 相当于 mRNA（见 9.5 节）。有趣的是，肠道细菌的 RNA 病毒只感染那些含有可接合转移质粒的细菌细胞（见 10.9 节和 10.11 节），这种质粒使得这类细菌细胞能够作为遗传物质传递的供体，或称为雄性。这些病毒感染细菌时吸附于这种质粒编码的性毛上（图 16.1）。

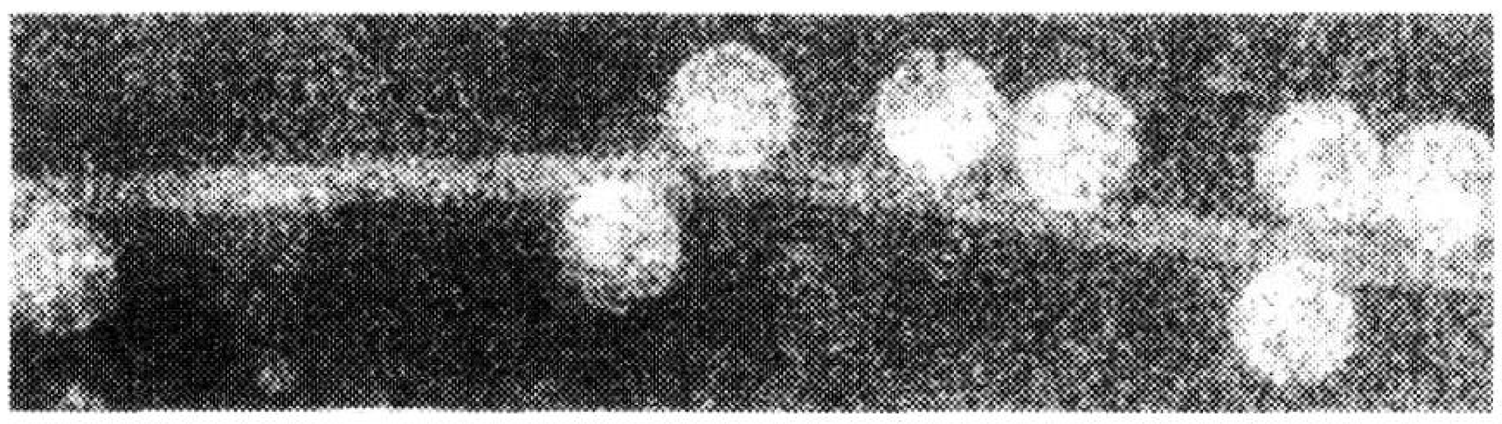


图 16.1 小 RNA 噬菌体。 *E. coli* 供体细胞性毛的电镜照片，显示一个小 RNA 噬菌体病毒粒子吸附在性毛上。

MS2 噬菌体

RNA 病毒都非常小，约 25nm，都是二十面体（见 9.2 节）。每个病毒粒子有 180 个衣壳蛋白拷贝。已经知道了一些 RNA 噬菌体基因组完整的核酸序列。例如，感染大肠杆菌（*Escherichia coli*）的 MS2 RNA 噬菌体共有 3569 个核苷酸。

MS2 的基因图谱见图 16.2a，其增殖过程见图 16.2b。它的小基因组只编码 4 种蛋白质：成熟蛋白质（maturation protein，在成熟的病毒颗粒中只以单拷贝存在）、衣壳蛋白（coat protein）、裂解蛋白（lysis protein，参与成熟病毒粒子的释放）和 RNA 复制酶（RNA replicase）的一个亚基，这种酶能够引发病毒 RNA 复制。有趣的是，RNA 复制酶是一种复合蛋白，由病毒编码的多肽部分和宿主编码的多肽部分组成。成熟蛋白质行使蛋白酶的功能，加工产生感染性病毒必需的一些病毒蛋白质。

MS2 的基因组是正链 RNA，进入细胞后可以立即被翻译（见 9.7 节）。当 RNA 复制酶合成后，该酶又能够以基因组 RNA 为模板催化合成负链 RNA（图 9.11），然后又以负链 RNA 为模板合成更多的正链 RNA。新合成的正链 RNA 作为信使继续病毒蛋白质的合成。编码成熟蛋白质的基因在 RNA 的 5′端，由于 RNA 的超折叠（见下面），成熟蛋白质的合成被限制。

病毒 RNA 被进一步折叠成具有二级结构的复合物。在 mRNA 的 4 个 AUG 起始位点中，衣壳蛋白基因 mRNA 最容易进行翻译，翻译开始得很早，复制酶的 mRNA 也较早翻译。当细胞中衣壳蛋白分子数量增加时，它们结合在复制酶 mRNA 的 AUG 起始位点，有效终止复制酶的合成。成熟蛋白质起始位点被大量限制，因此，合成量很少。衣壳蛋白是被合成的最主要的蛋白质，因为它的需要量最大。

MS2 的基因重叠与装配

MS2 的一个有趣的特征是它的第 4 种蛋白质，即裂解蛋白，其编码基因与衣壳蛋白基因和复制酶基因是重叠的（图 16.2a）。重叠基因（overlapping gene）现象在小基因组中很常见（见 16.2 节）。值得注意的是，重叠基因使得小基因组遗传信息的使用更

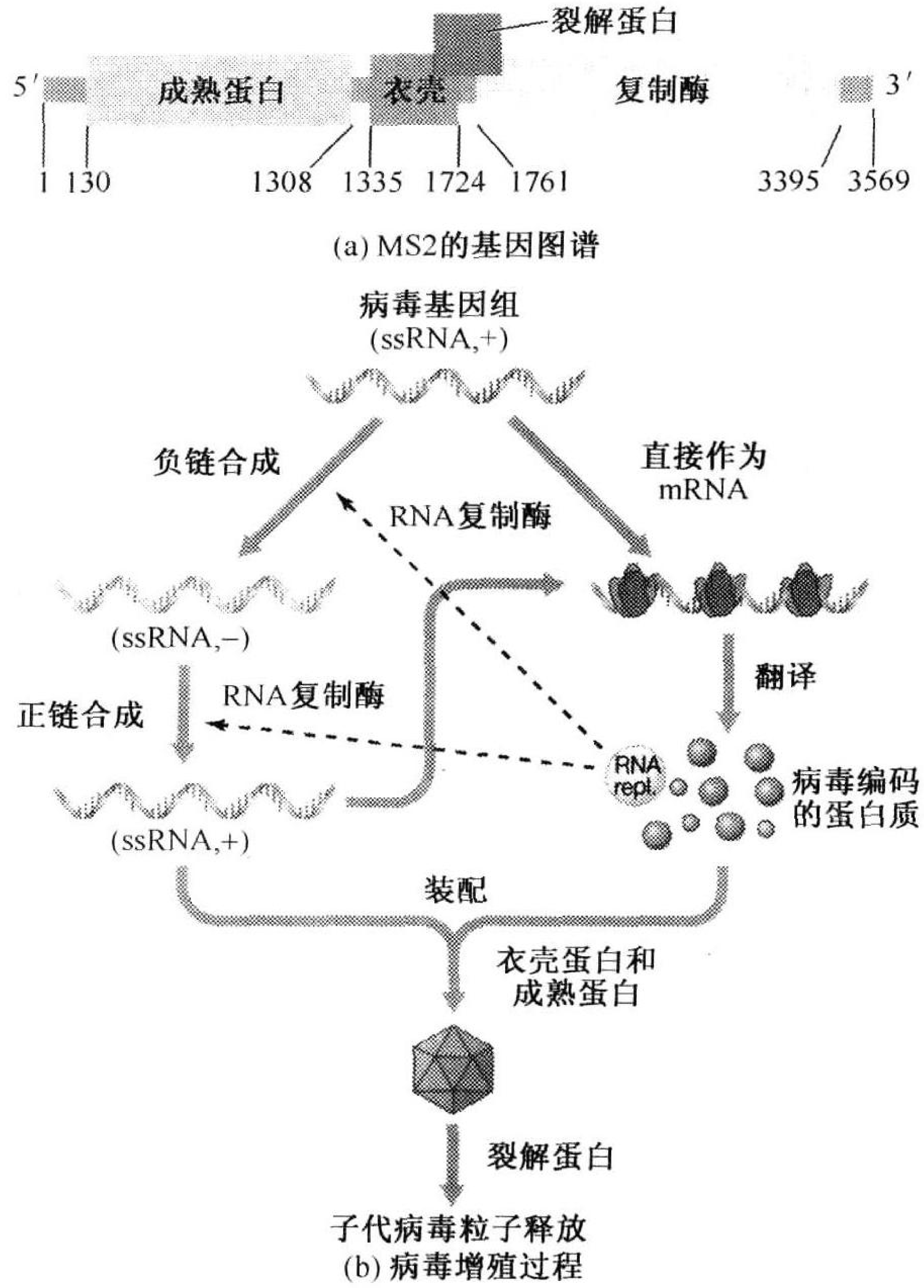


图 16.2 MS2 噬菌体。 (a) RNA 噬菌体 MS2 的基因图谱。注意裂解蛋白基因如何与衣壳蛋白和复制酶基因重叠。其中的数字表示 RNA 上核苷酸的位置。(b) 增殖过程。

为有效。因为 RNA 存在着二级结构，MS2 的裂解酶基因的起始密码子不易与核糖体接触。然而，当核糖体终止对衣壳蛋白基因的合成时，这个区域的二级结构被破坏，有时核糖体就能起始阅读裂解基因。病毒通过这种方式限制翻译的效率，避免在成熟前细胞发生裂解。因此，只有在衣壳蛋白达到足够拷贝数供病毒装配成成熟的病毒颗粒时，裂解才开始。

最后，进行噬菌体的自我装配，而且随着细胞的裂解病毒粒子释放出来。这些简单 RNA 病毒，如 MS2，复制相当简单：病毒 RNA 本身作为 mRNA，通过控制病毒 RNA 上适当的起始位点与核糖体的接触进行调控。

已知许多正链 RNA 病毒在生物学性质上与 MS2 相似，但尚未发现噬菌体含有负链 RNA 基因组，后者在真核病毒中常见（见 16.9 节）。然而，有一部分噬菌体含有双链 RNA 片段作为遗传物质，研究最清楚的是 Φ6，它的宿主为丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）。这种有囊膜（enveloped）病毒（被脂质膜包裹，图 9.12）看上去与感染真核细胞的反转录病毒十分相似（见 16.10 节）。

概念检查

有许多感染细菌的 RNA 病毒是已知的。这些细菌病毒的小 RNA 基因组直接编码和翻译几种蛋白质。

◆ 正链 RNA 病毒与负链 RNA 病毒在基因组上的区别是什么？

◆ 描述一下重叠基因意味着什么？

16.2 二十面体单链 DNA 噬菌体

许多噬菌体含有正链单链 DNA 基因组，这种基因组在转录前，必须合成一条互补 DNA 链，形成双链分子（见 9.7 节和图 9.11）。这些噬菌体复制此双链 DNA，但其子代病毒只包装正链 DNA（已知的噬菌体中没有负链 DNA 基因组）。这一节讨论这类噬菌体中了解最为透彻的一种——ΦX174。下一节介绍单链 DNA 噬菌体 M13，它是基因工程的重要工具（见 15.1 节），具有与 ΦX174 不同的生活周期。

ΦX174 噬菌体是一种包含环状单链 DNA 基因组、二十面体结构的病毒，这些病毒很小，直径 25nm 左右，衣壳蛋白的基本构造单位是一种单一的蛋白质，共 60 个拷贝，可能是二十面体病毒含有最小数量蛋白质亚基的病毒，在二十面体的顶角有一些由其他蛋白质形成的刺突状结构（图 9.12）。这些小 DNA 病毒的基因组含有的遗传信息很有限，它们主要利用宿主细胞的 DNA 复制机制进行病毒 DNA 的复制。

噬菌体 ΦX174 的基因组

噬菌体 ΦX174 感染 *E. coli*，其基因组是一个环状单链分子，有 5386 个核苷酸。ΦX174 DNA 是第一个完成全部序列测定的基因组，1977 年由 Frederick Sanger 及其合作者完成，这在当时是一项惊人的成就。现在 DNA 测序已成为常规的方法并已高度自动化（见 7.8 节）。ΦX174 也特别有趣，因为它是最早被发现有重叠基因的遗传因子。重叠基因的概念请参考 RNA 噬菌体 MS2（见 16.1 节）。例如，ΦX174 基因组中基因 B 包含于基因 A 中，基因 K 包含于基因 A 和基因 C 中（图 16.3）。在非常小的病毒如 ΦX174 中，DNA 不足以编码所有病毒特有的蛋白质，除非某些病毒核苷酸序列以不同的可读框被多次阅读（图 16.3）。

从 ΦX174 的基因图谱中可以看到，基因 D 和 E 的序列相互重叠，基因 E 完全包含在基因 D 内部。另外，基因 D 的终止密码子与基因 J 的起始密码子重叠（图 16.3a）。此外，ΦX174 中称为 A* 蛋白的小蛋白质，是在基因 A 的 mRNA 上重新起始的翻译（不是转录）产生，与 A 蛋白 mRNA 可读框有相同的终止位点，但却在不同的密码子处起始翻译，是一个更小的蛋白质。

DNA 滚环复制机制

这种单链基因组 ΦX174 的复制过程相当有意思，在细胞中总是以双链构型进行复制（见 7.5 节）。当感染宿主后，正链的 DNA 链脱离蛋白衣壳，进入细胞，并转换成

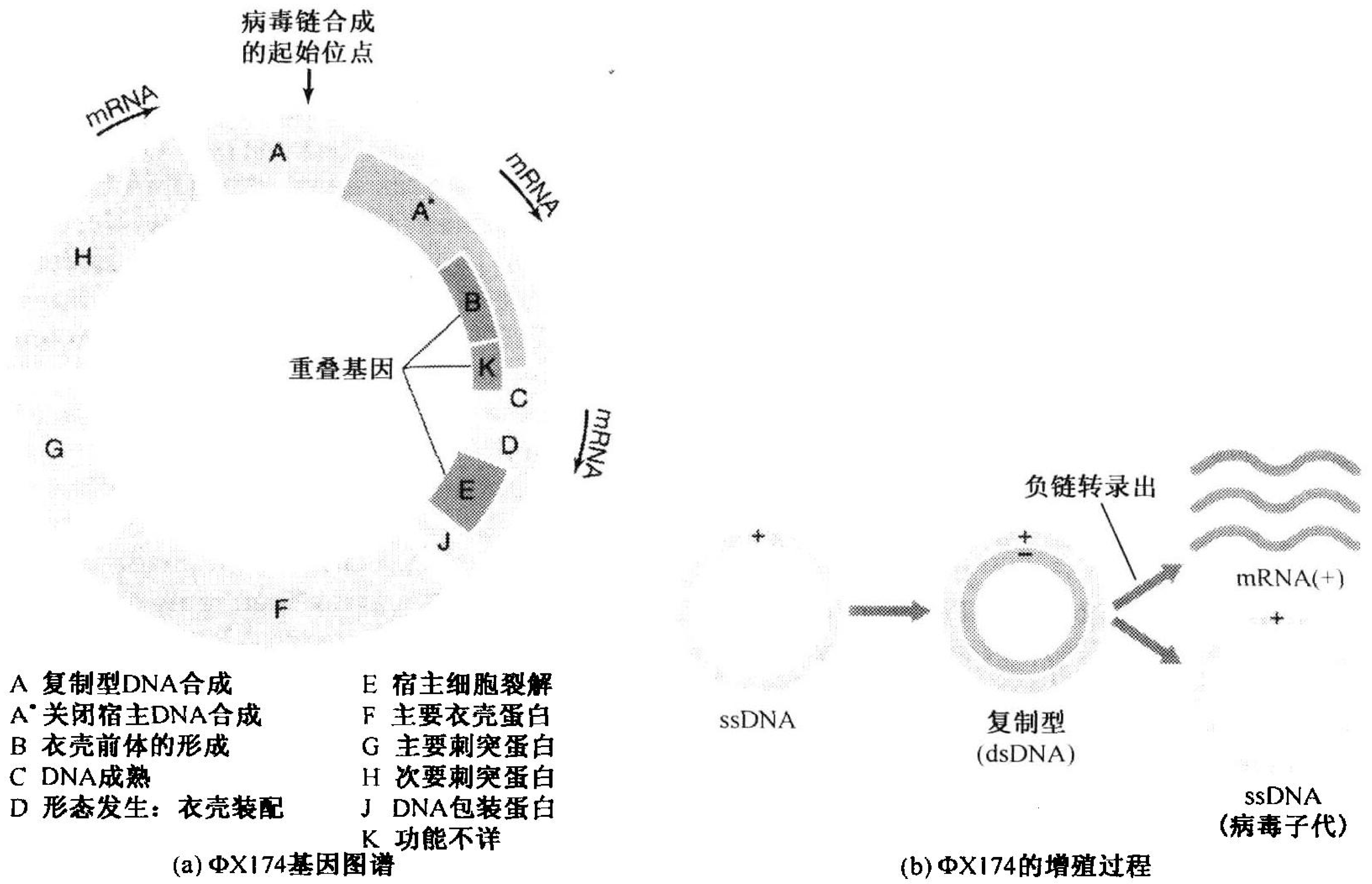


图 16.3 噬菌体 ΦX174，一种单链噬菌体。 (a) 遗传图谱。标注出基因重叠区域（A/B、K/B、K/C、K/A 和 D/E）。基因内部区域没有标颜色。蛋白质 A* 是基因 A 的一部分重新开始翻译形成的（见正文）。(b) ΦX174 的增殖过程。复制型 dsDNA 产生子代 ssDNA 是通过滚环复制进行的，详细过程见图 16.4。

为双链的复制型（replicative form，RF）DNA（图 16.3b）。参与病毒 DNA 转换为 RF DNA 的细胞编码蛋白质有：引发酶、DNA 聚合酶、连接酶和促旋酶（见 7.5 节）。

在细胞里，后滞链的复制需要一种由引发酶形成的短的 RNA 引物（见 7.5 节），这些 RNA 引物在后滞链上有间隔地形成，然后在 DNA 聚合酶Ⅰ的作用下被切除，并以 DNA 进行取代（图 7.16）。ΦX174 DNA 的情况相似，但是 DNA 的复制开始于一个单链闭合的环。为了起始这个 DNA 的复制，引发酶在一个或多个特异起始位点合成短的 RNA 引物。然后在 DNA 聚合酶Ⅲ的作用下合成 DNA。接着，引物再被切除，在 DNA 聚合酶Ⅰ的作用下合成 DNA，就像后滞链的复制一样。这样就完成了完整的环状双链复制形式 DNA。

一旦这种复制形式完成了，DNA 就开始传统的半保留复制，形成 θ 形中间体（图 7.16），复制型形成后，ΦX174 mRNA 形成，而后产生各种病毒蛋白质。只是单链病毒基因组的形成还要有另一种称为滚环复制（rolling circle replication）的机制参与（图 16.4）。暴露的 DNA 的一条链被切开，切口的 3′端引发一条新链的合成，因而形成滚环。这个环不断地滚动，形成一个线性、单链的 ΦX174 基因组结构。值得注意的是，合成是不对称的，因为只有一条链（负链）被用作模板。与 λ 噬菌体的 DNA 复制相比较，其复制同样采用滚环复制机制，但后者为双链 DNA 噬菌体（图 9.20）。

在 ΦX174 中，当基因 A 蛋白切割 RF 的正链时，合成才开始。当那条生长的病毒

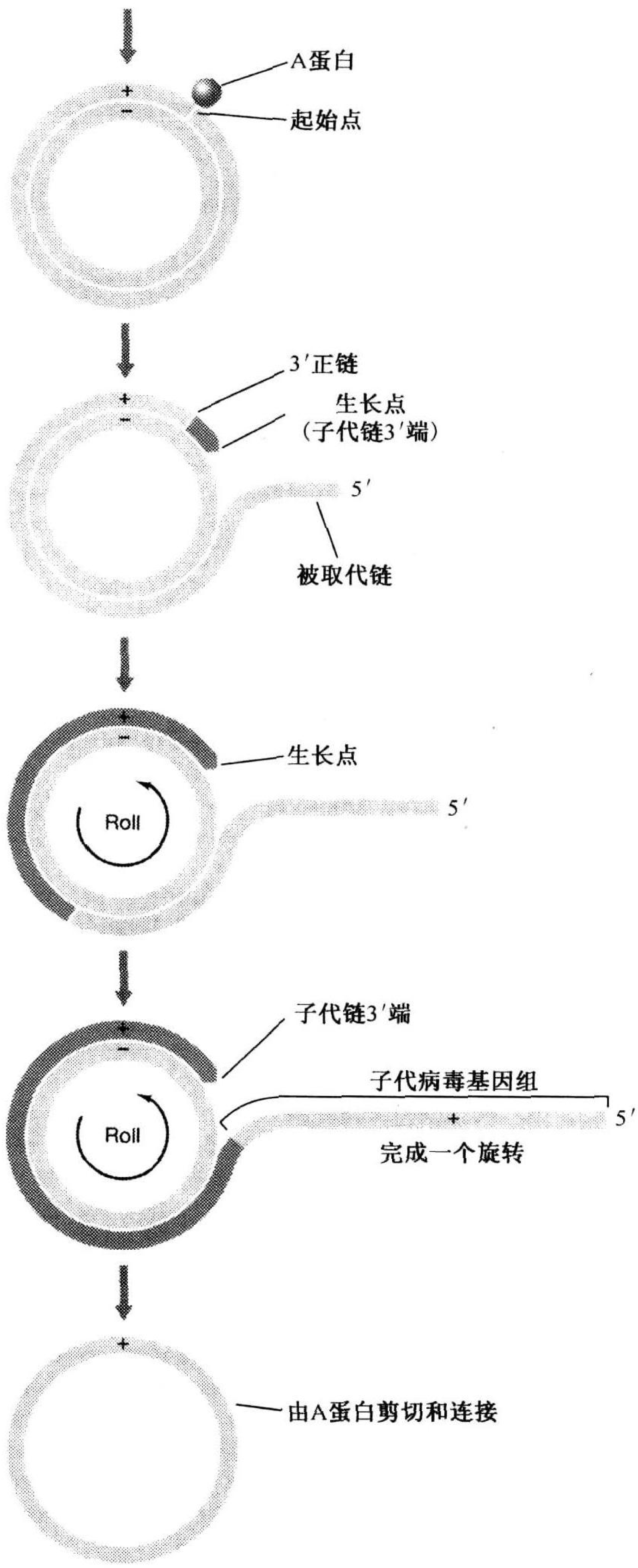


图 16.4　噬菌体 ΦX174 的滚环复制。复制开始于复制型双链的正链被 A 蛋白切割的原点（复制型的两条链在图中用浅绿色标注）。一条新的子代链合成之后（滚环的一个旋转），基因 A 蛋白切掉新链，并将其两个末端连接上。

链达到单位长度（ΦX174 是 5386 个核苷酸残基）时，基因 A 蛋白会进行切割并连接新生成单链的两个末端，形成单链环状 DNA。

ΦX174 的转录和翻译

ΦX174 病毒 mRNA 的合成由复制模式的 DNA 来指导。mRNA 的合成起始于一些主要启动子并终止于某些位点（图 16.3a）。多顺反子 mRNA 分子（见 7.3 节）可翻译成多种蛋白质。我们已经注意到，一些蛋白质从相同的 DNA 序列（重叠基因，图 16.3a）转录出的 mRNA 上以不同可读框翻译出来。像 ΦX174 这样小的基因组能如此高效地被使用，编码出许多种不同蛋白质的确给人以深刻印象。

最后是成熟 ΦX174 病毒粒子的装配。细胞裂解以释放病毒粒子，这个过程需要 E 蛋白的参与。有趣的是，E 蛋白通过抑制参与细胞壁中肽聚糖合成的一种酶的活性来催化裂解（见 6.3 节）。由于其导致新合成的细胞壁物质有缺陷，细胞最终裂解，释放出病毒颗粒。

概念检查

病毒 ΦX174 的单链 DNA 基因组很小，重叠基因的存在使得它能编码所有重要的蛋白质。这个病毒是生物学上最早发现的重叠基因的例子。子代病毒 DNA 的产生通过滚环复制机制完成。

◆ 如果 ΦX174 的核酸基因组是单链正向构型，那么为什么它不能像 MS2 基因组那样被直接作为 mRNA?

◆ ΦX174 病毒核酸的复制型与病毒粒子中的核酸类型有何区别?

16.3 丝状单链 DNA 噬菌体

丝状 DNA 噬菌体与 ΦX174 有很大区别，其病毒粒子是螺旋状的而不是二十面体对称结构。这一类群中被研究得最为深入的是噬菌体 M13，能感染 *E. coli*，相关的噬菌体还有 f1 和 fd。像小 RNA 噬菌体一样，这些丝状噬菌体只感染雄性细胞，吸附于性毛后进入细胞（见 10.11 节和图 16.1）。尽管这些噬菌体外形是线状的，但如同 ΦX174 一样，它们有着环状单链的 DNA 基因组。

M13 噬菌体

M13 噬菌体是典型的丝状噬菌体，已广泛用作克隆载体和 DNA 测序的工具（见 15.1 节）。M13 粒子的直径只有 6nm、长 860nm。这些丝状 DNA 噬菌体从细胞中释放时并不裂解宿主细胞。因此，受 M13 感染的细胞仍可继续存活，并持续释放出病毒粒子（virion）。病毒的感染使得细胞生长变慢，但是这个细胞能与病毒共存。它感染细菌后不出现典型的清亮噬菌斑（图 9.6b），但可以观察到菌苔上感染菌体生长变慢区域所形成的混浊噬菌斑。

丝状噬菌体 DNA 的复制在许多方面与 ΦX174 很相似（见 16.2 节和图 16.4）。但释放时采用并不杀死细胞的出芽方式。在这种机制中，病毒包含许多 A 蛋白的尾部被首先释放，其余部分紧随其后（图 16.5）。M13 噬菌体并不在细胞中累积，成熟病毒粒

子的装配发生在质膜内表面，病毒的装配伴随着出芽过程。

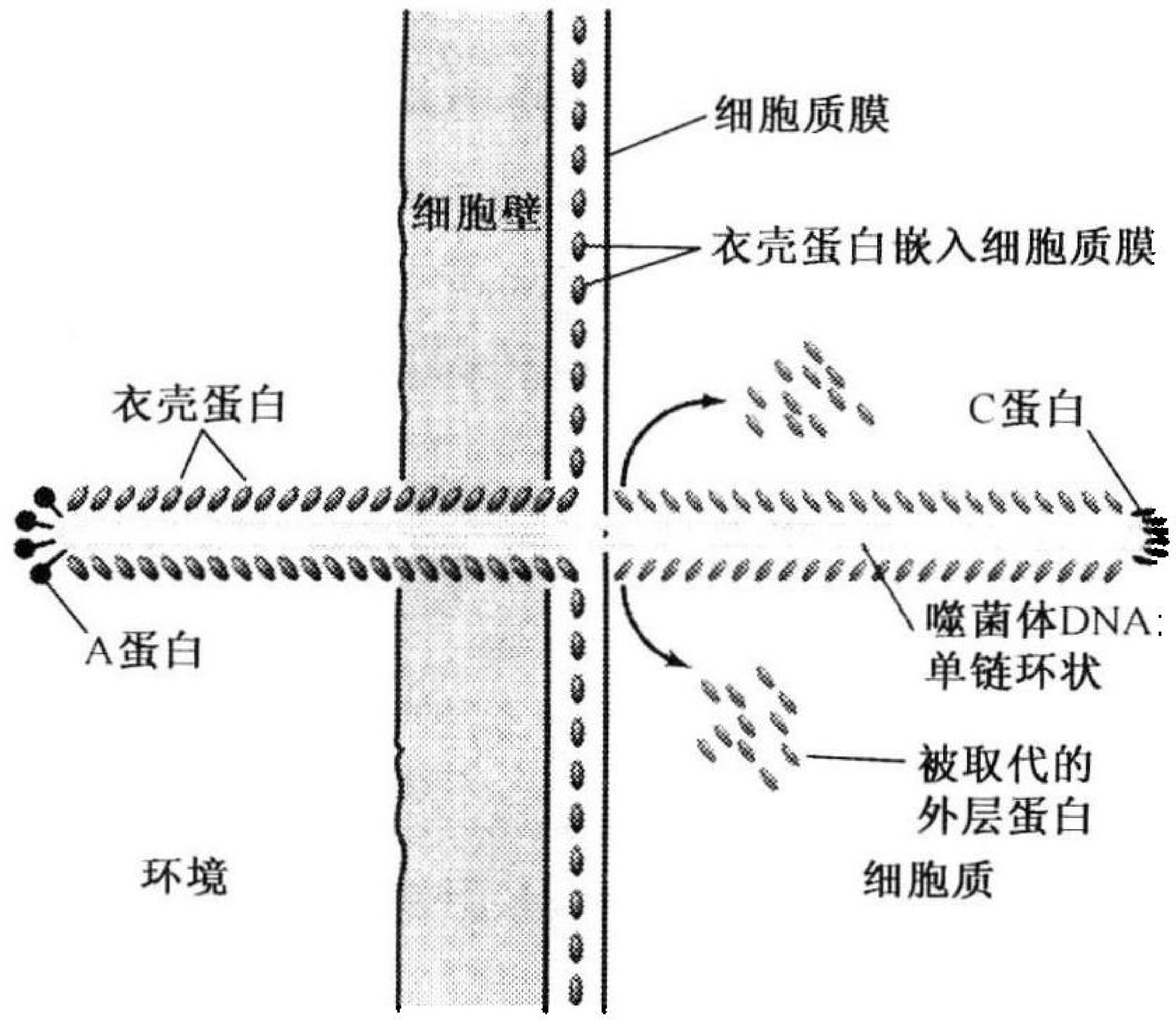


图 16.5　丝状噬菌体的释放。图中阐释丝状单链噬菌体采取的方式（如 M13 或 fd），粒子不经细胞裂解而离开被感染细胞。A 蛋白首先通过细胞膜上镶嵌有衣壳蛋白分子的位点，环状 DNA 开始由其他的噬菌体蛋白二聚体包围，进而 DNA 穿过整个细胞膜进入衣壳蛋白形成的外壳。

M13 噬菌体和基因工程

M13 噬菌体的某些特征使它们成为克隆和 DNA 测序的有力工具。①它们有单链 DNA，可以用 Sanger-双脱氧核糖核酸法进行测序（见 7.8 节）；②当噬菌体形成复制型时可以天然形成用于克隆的双链基因组 DNA；③被感染细胞能保持生长状态，因此可以无限地保持着克隆 DNA；④如 λ 噬菌体（见 9.18 节、10.7 节和图 9.17）一样，M13 噬菌体基因组内有些空间并不编码蛋白质，能够被外源 DNA 取代（见 15.1 节）。因为这些和其他一些原因，M13 噬菌体是生物技术学家重要的研究工具。

概念检查

一些丝状单链 DNA 病毒如 M13 是 DNA 测序和基因工程的有力工具，同时它们释放时不真正杀死宿主。

◆ 描述 M13 基因组，并指出其与噬菌体产生的 mRNA 的联系是什么。

◆ M13 如何在不杀死宿主细胞的情况下释放？

16.4　双链 DNA 噬菌体：T7

双链 DNA 噬菌体是病毒中研究最为深入的部分，我们已经在第 9 章讨论过它们中的两个，T4 和 λ（见 9.9 节和 9.10 节），由于它们是了解分子生物学和基因调节的重要模型，我们将在本节和下节讨论这两个病毒——T7 和 Mu。

噬菌体 T7 的复制早期

T7 和近缘种 T3 都是感染 *E. coli* 和其他肠道细菌，特别是志贺氏菌属（*Shigella*）细菌的小 DNA 病毒。病毒粒子有二十面体的头部和一个很小的尾部（图 16.6）。

T7 基因组是线状双链 DNA 分子，39 936bp。存在基因重叠现象（见 16.1 节和 16.2 节），这与某些基因内部的翻译重新起始和内部可读框变换类似，都是为了最大限度地利用遗传信息，我们在讨论此策略时请参考 16.2 节中的 ΦX174。

T7 的基因图谱如图 16.6。T7 染色体上基因的顺序影响病毒增殖的调控。当病毒粒子与细菌细胞吸附时，DNA 以线性注入，基因图谱左端的基因通常首先进入细胞。左端的一些基因利用 3 个距离很近的启动子立刻被细胞中的 RNA 聚合酶转录。其中一种早期蛋白能抑制宿主保护细胞免受外源 DNA 侵害的限制系统（见 7.7 节），这种抑制作用发生得非常快，抗限制系统的蛋白质在整个 T7 基因组进入细胞之前就被合成了。

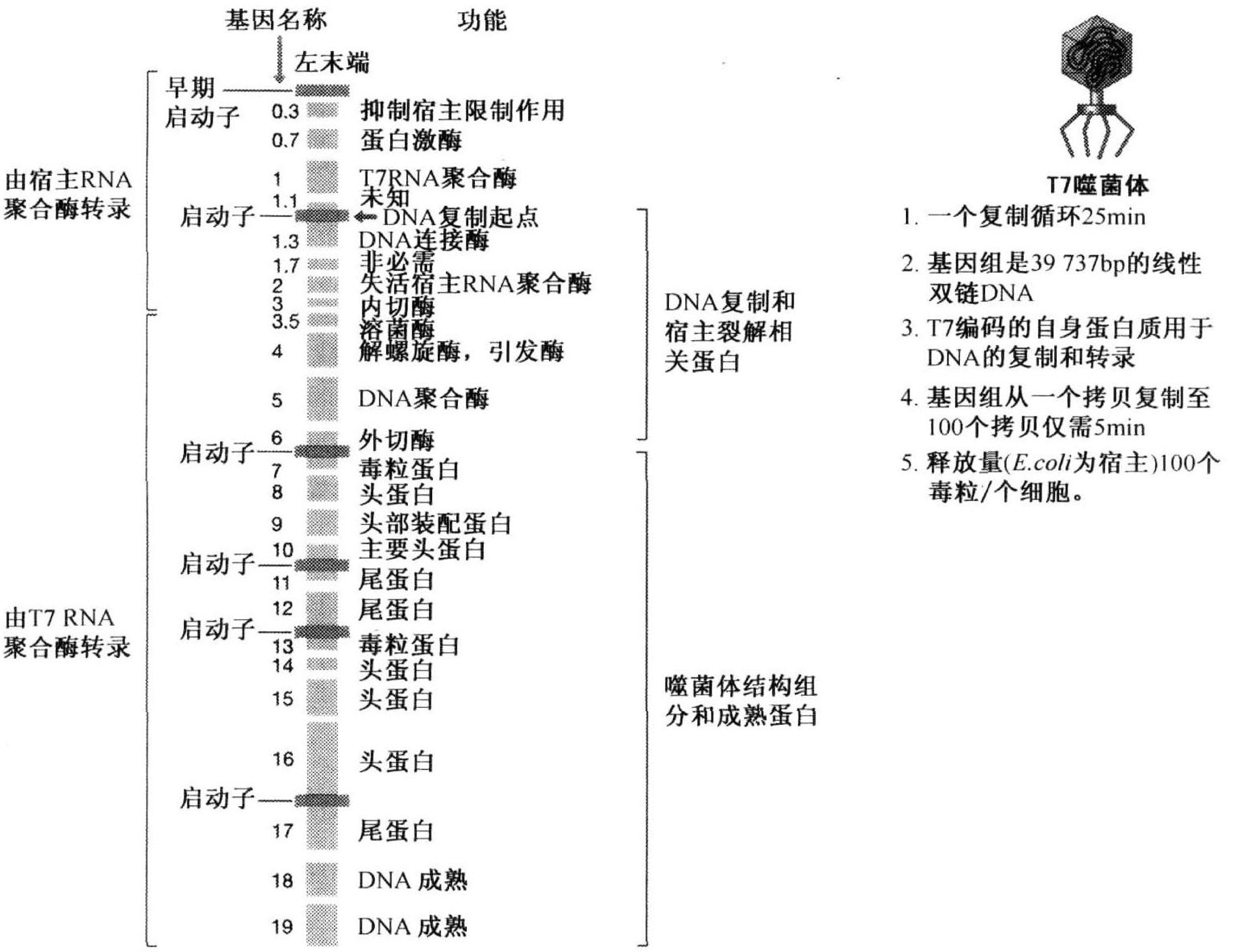


图 16.6 T7 噬菌体的遗传图谱，表示了基因的数目，近似的大小和基因产物的功能。从早期启动子开始的转录是宿主 RNA 聚合酶参与，从其他启动子开始的转录由 T7 RNA 聚合酶催化。基因用数字标明。

另一种早期蛋白是病毒的 RNA 聚合酶，称为 T7 RNA 聚合酶（T7 RNA polymerase）。另外两个早期 mRNA 分子编码的蛋白质负责抑制宿主 RNA 聚合酶的作用，从而能够终止早期基因的转录，就像终止宿主基因的转录一样。宿主的 RNA 聚合酶只在早期将少数几个基因转录为 mRNA，然后 T7 噬菌体特有的 RNA 聚合酶参与噬菌体转

录的主要过程。

T7 RNA 聚合酶只利用分布于噬菌体基因组中的特有启动子（图 16.6）。T7 RNA 聚合酶对这些启动子非常特异（其序列与典型的 *E. coli* 启动子不相关，见 7.10 节和 7.11 节）。这种酶也是一种效率极高的 RNA 聚合酶（基因工程中已应用 T7 RNA 聚合酶这一高效酶转录基因，见 31.4 节）。这一情况与 T4 噬菌体不同，在感染过程中它是利用宿主细胞的 RNA 聚合酶和 T4 特异性的 σ 因子（见 9.9 节）。

T7 基因组的复制

T7 DNA 的复制起始于一个单复制起始点（图 16.6），双向进行（图 16.7）。在电镜下可观察到正在复制的 T7 DNA 的特征性结构。因为复制起始点靠近左末端，通常

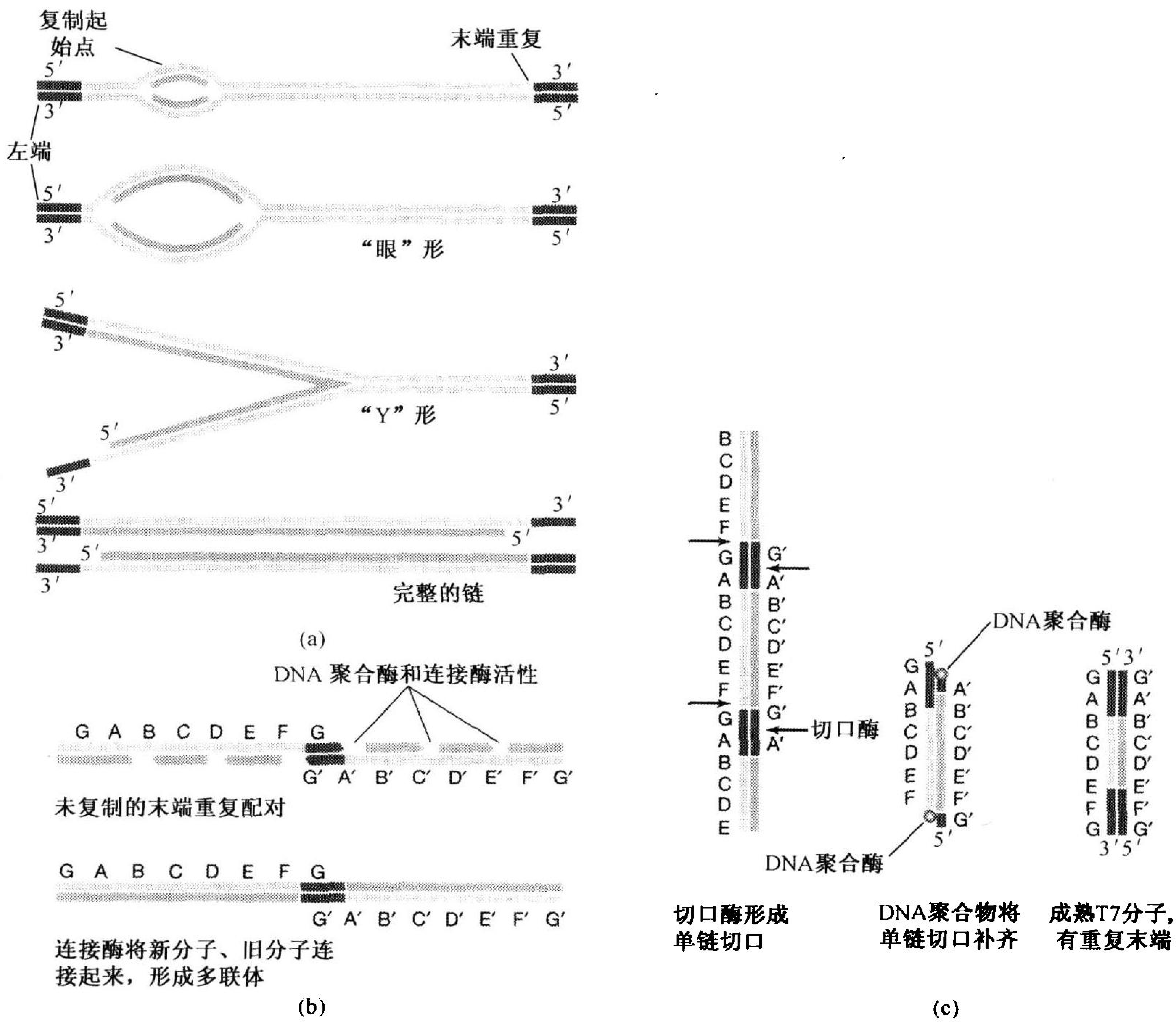


图 16.7　噬菌体 T7 线性双链 DNA 基因组的复制。（a）DNA 双向复制产生"眼"形和"Y"形中间体（为易于分辨，模板链用浅绿色表示，新合成的链用深绿色表示）。（b）非复制末端 DNA 分子连接起来形成连体，基因的名称是随意写的。（c）通过核酸酶作用 T7 连体，产生成熟的病毒 DNA 分子。左图：在特异序列的单链上酶切（箭头）；中图：DNA 聚合酶合成单链末端；右图：成熟的 T7 分子有末端重复。T4 噬菌体也使用重组来帮助其线性基因组复制；比较图 16.7（c）和图 19.3。

呈“Y”形，在复制早期，则出现泡状分子（图 16.7）。复制过程中一些病毒编码的蛋白质包括 T7 特异性的 DNA 聚合酶也会参与，这与 ΦX174（见 16.2 节）和 T4 噬菌体（见 9.9 节）有所不同。

T7 RNA 有一种特征性结构对于它的复制非常重要，即在分子末端有一个 160bp 的正向末端重要序列。为了复制 5′端的 DNA，需要在复制完成以前将 RNA 引物去除。因此在 T7 DNA 每条链 5′端都有一个非复制部分（图 16.7a 下部）。正如在 14.6 节中讲述的那样，线性 DNA 基因组有许多种策略来解决复制中的这一问题。对于 T7 来说（同样适用于 T4），就是在末端有重复序列（见 9.9 节）。在两个独立的 DNA 分子上对应的 3′链能够与这些 5′链配对，形成一个二聚体，长度是 T7 DNA 的 2 倍（图 16.7b），这个结构上的非复制区域通过 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶来填补，形成一个线性双分子称为多联体（concatemer）。

连续的复制相重组就能形成有相当长度的多联体。但最终噬菌体编码的核酸酶会在特异位点切割多联体，形成正常的有末端重复的线性病毒分子（图 16.7c）。由于 T7 类似于 λ 但不同于 T4，它在特异序列处切割多联体，每个 T7 的 DNA 序列都是相同的，这一点不同于 T4。此病毒加工 DNA 使用“头部包装机制”，意为 DNA 不但末端冗余，而且环化（见 9.9 节）。

概念检查

T7 噬菌体双链 DNA 基因组总是以同一方向进入细胞。晚期基因由病毒编码的 RNA 聚合酶转录。T7 基因组的复制策略依靠 T7 DNA 聚合酶，末端重复及多联体形式。

- ◆ T7 基因组由单一方向进入细胞的意义。
- ◆ 末端重叠的含义。
- ◆ T4 与 T7 DNA 复制方式的异同。

16.5 Mu：双链可转座的 DNA 噬菌体

Mu 与 λ 类似（见 9.11 节），是一种温和噬菌体，但是它具有一种特殊的性质，即作为一种可转座因子（transposable element）进行复制（见 10.14 节）。之所以称之为 Mu，是因为它是一种增变（mutator）噬菌体，能够诱导它所整合的宿主基因组发生突变。Mu 的基因组能插入到宿主基因的中部，使这些基因失活。于是受 Mu 感染的宿主成为突变子；Mu 是一种很有用的噬菌体，因为利用它很容易产生各种细菌突变体。Mu 也是基因工程的重要工具。

转座因子是一些 DNA 片段，能够从宿主基因组的一个位点移到另一个位点，原核生物和真核生物中都存在转座因子，它们在遗传变异中起重要作用（见 10.14 节）。尽管 Mu 是一种噬菌体，但 Mu 实际上是很大的转座因子，转座过程伴随其 DNA 的复制。

Mu 的基本性质

噬菌体 Mu 是一个大病毒，有 1 个二十面体头部，1 个螺旋状的尾和 6 条尾丝（图 16.8）。Mu 的基因组为线性双链 DNA，遗传图谱见图 16.9a。可以看出，大部分基因主要是用来合成头部和尾部蛋白，两端则含有参与复制和决定宿主范围的基因。

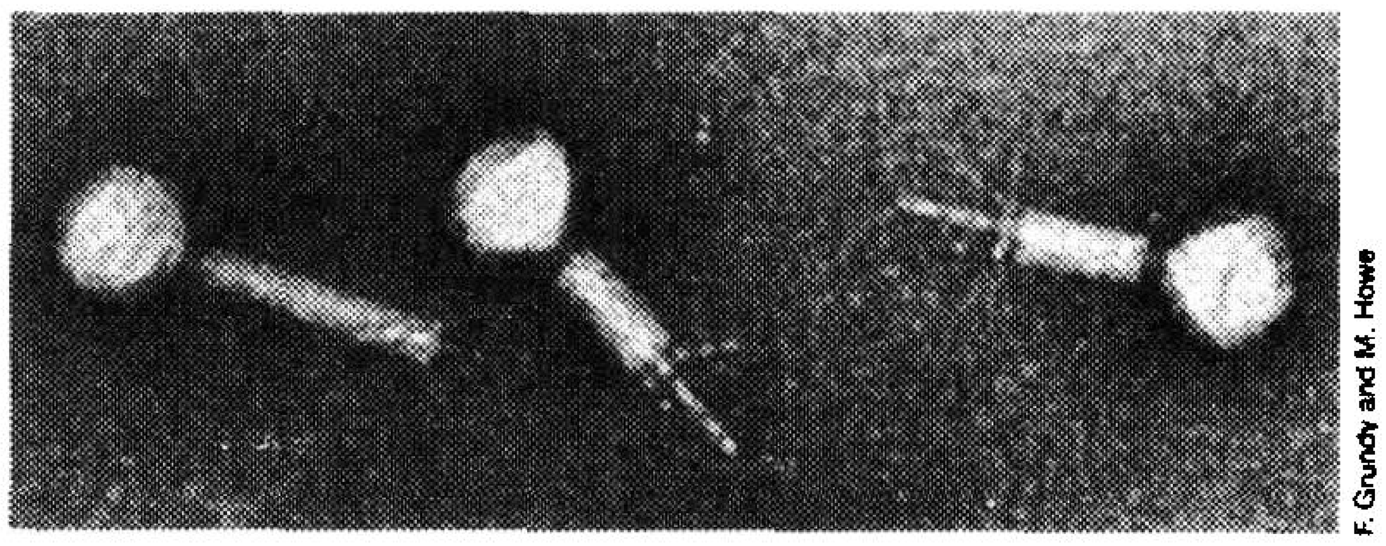


图 16.8　噬菌体 Mu。 双链 DNA 噬菌体 Mu，即增变噬菌体的电镜图片。

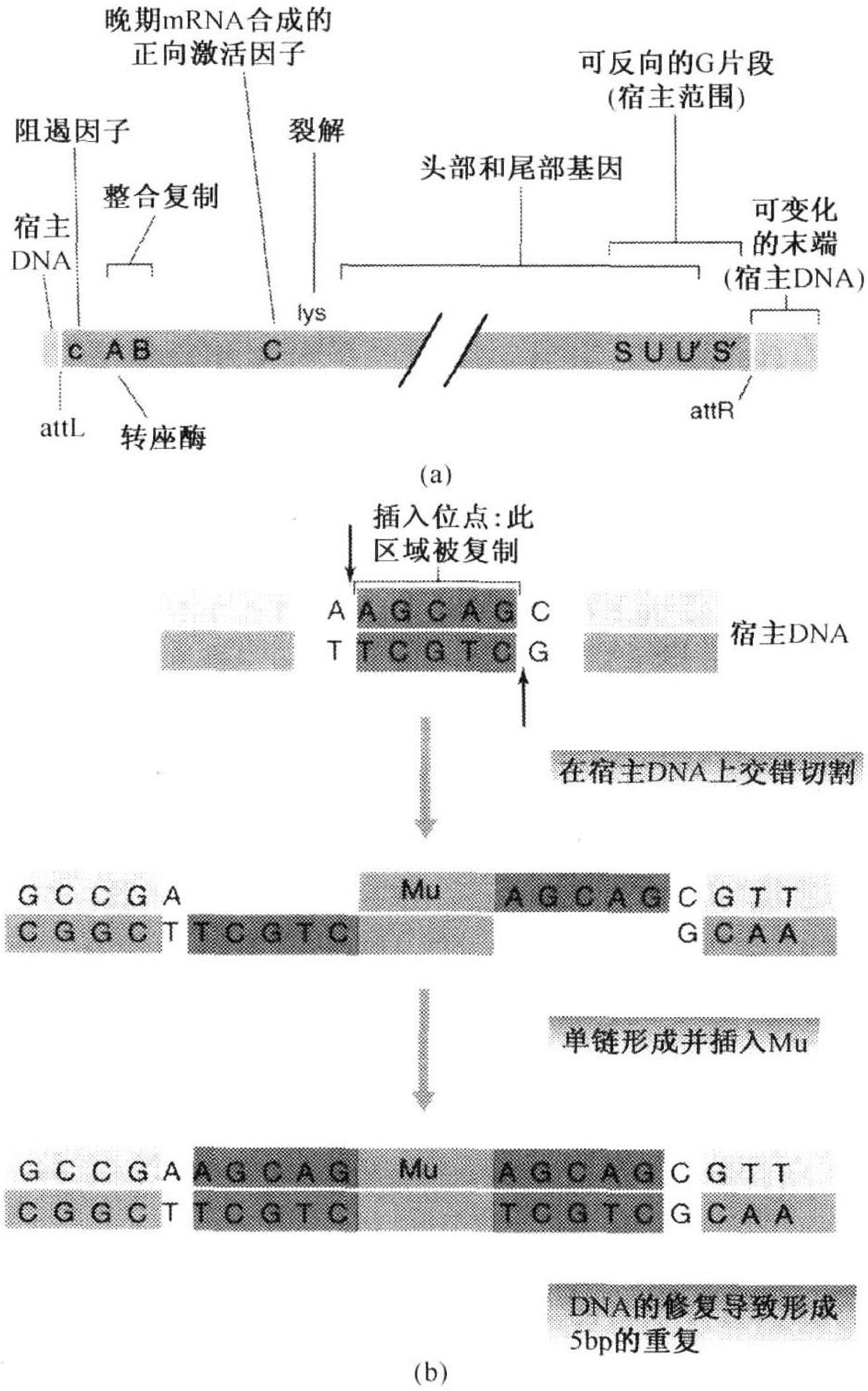


图 16.9　噬菌体 Mu 的复制。 （a）Mu 的基因图谱。细节见正文。注意小写的 *c* 基因编码阻遏因子，大写的 *C* 基因编码激活蛋白。头和尾的基因没有画在图中。（b）Mu 整合到宿主 DNA，宿主 DNA 产生 5bp 的重复。

Mu 病毒粒子中的 DNA 分子大小约 39kb，但是只有 37.2kb 构成真正的 Mu 基因组。这是因为长 DNA 分子的两个末端都带有宿主 DNA。在 Mu DNA 左末端有 50～150bp 的宿主 DNA，右末端有 1～2kb 宿主 DNA。这些宿主 DNA 序列与 Mu 曾经插入过的宿主基因组位点附近的 DNA 序列是一致的。这些是如何发生的？

当一个 Mu 噬菌体粒子形成时，从宿主上面切除一段带有 Mu 基因组、长度恰好能被头部包装进去的 DNA。DNA 被卷入到头部里面，直至头部装满，但 DNA 被切割的右末端位置在不同的噬菌体颗粒中是变化的。这样，如遗传图谱所示，噬菌体右末端可能含有不同的宿主 DNA 序列（*attR* 位点右侧）。因此，从同一个感染细胞中产生的每个病毒粒子由于含有不同的宿主 DNA 而具有遗传的独特性。

Mu 及可倒置的 G 区域

如基因图谱（图 16.9a）所示，Mu 基因组中有一个特殊的片段称为 G，它的方向是可变换的，方向标为 G^+ 或相反的 G^-。该片段的方向决定产生哪种类型的尾丝。由于尾丝与细胞膜表面的相互作用恰好能控制与宿主的吸附，因此，Mu 的宿主范围就是由它的这个可变换片段的方向决定的。例如，如果 G 片段方向为 G^+，则噬菌体颗粒能够感染 *E. coli* K12。相反，如果 G 片段方向为 G^-，它能感染 *E. coli* C 或其他一些肠杆菌属的菌株。两个尾丝蛋白的编码基因位于 G 片段的两条链上。

G 片段左端是控制 G 片段转录的启动子。在 G^+ 方向上，起始 *S* 和 *U* 基因转录的启动子是活跃的，而在 G^- 方向，由另一个启动子负责相反链上的基因 S' 和 U' 的转录。G 片段的倒置很少发生，它受 G 片段附近基因的控制。我们把这种倒置现象视为侵染不同宿主细胞的简单机制。

Mu 的复制

我们讨论过的含有双链 DNA 基因组的噬菌体，T4（见 9.9 节）、λ（见 9.10 节）和 Mu 都是线性基因组，即使这样，病毒运用 3 种不同策略复制其末端基因组（见 14.6 节）。T4 和 T7 有末端重复序列，并利用重组形成多联体。相比之下，λ 基因组在感染后环化。然而，Mu 具有其他噬菌体没有的特殊性质，其基因组作为更大 DNA 分子的一部分被复制。

当 Mu DNA 进入宿主细胞后，DNA 被一种修饰系统所保护，免受宿主限制系统的破坏，其中会有 15%的腺嘌呤被乙酰化。与 λ 不同的是，Mu 整合到宿主的基因组中对于裂解和溶原生长都是必需的。整合需要一种基因 A 产物，即转座酶（transposase）。在 Mu DNA 整合的位点，宿主 DNA 上出现了 5bp 的重复序列（图 16.9b）。在 Mu 插入的位点上，宿主 DNA 被交错切割，产生的单链片段再转变为双链。于是形成短的宿主 DNA 的重复序列，这是转座因子插入时的典型特征。

Mu 的裂解途径是在感染开始时、Mu 的阻遏因子（*c* 基因产物）未被合成时发生，或是在溶原菌受到诱导后发生。在任何一种情况下，Mu DNA 的复制都伴随着 Mu 重复转座到宿主基因组上的多个位点。最初，Mu 上只有早期基因发生转录，不过当 C 蛋白（晚期转录的正激活因子）被表达时，能激活晚期 RNA 的合成，Mu 的头部和尾部蛋白质的合成就开始了。最后，裂解功能蛋白开始表达，成熟的噬菌体粒子被合成释

放。Mu 的溶原阶段需要阻遏蛋白的积累以阻止整合 Mu DNA 的转录。

概念检查

噬菌体 Mu 是一种温和病毒同时也是一种转座子，在溶原和裂解途径中，它的基因组都由转座酶活化而被整合入宿主染色体。即使在裂解途径中，它的基因组也作为大 DNA 分子的一部分而被复制，它的基因组被包入病毒颗粒同时在两端携带短宿主 DNA 序列。

◆什么是转座子?

◆Mu 使用什么机制确保线性基因组的两端被完整复制?

16.6 古生菌病毒

已发现许多宿主为古生菌的病毒，其宿主包括产甲烷（见 13.4 节）、嗜盐、嗜碱（见 13.3 节）和超嗜热菌（见 13.6～13.10 节）。大多数感染产甲烷和嗜盐古生菌的病毒具有头尾，类似如 T4 等感染肠道菌的噬菌体（见 9.9 节）。实际上，某些嗜盐古生菌的病毒，如盐沼盐杆菌（*Halobacterium salinarum*）的噬菌体 ΦH 和马加蒂湖无色嗜盐菌（*Natrialba magadii*）的噬菌体 ΦCh1，它们像 T4 一样，含有环化、末端冗余的线性双链 DNA 基因组。这些病毒包装 DNA 采用与 T4 相同的头部包装机制（见 9.9 节和图 9.13）。

硫化叶菌和火球菌的病毒

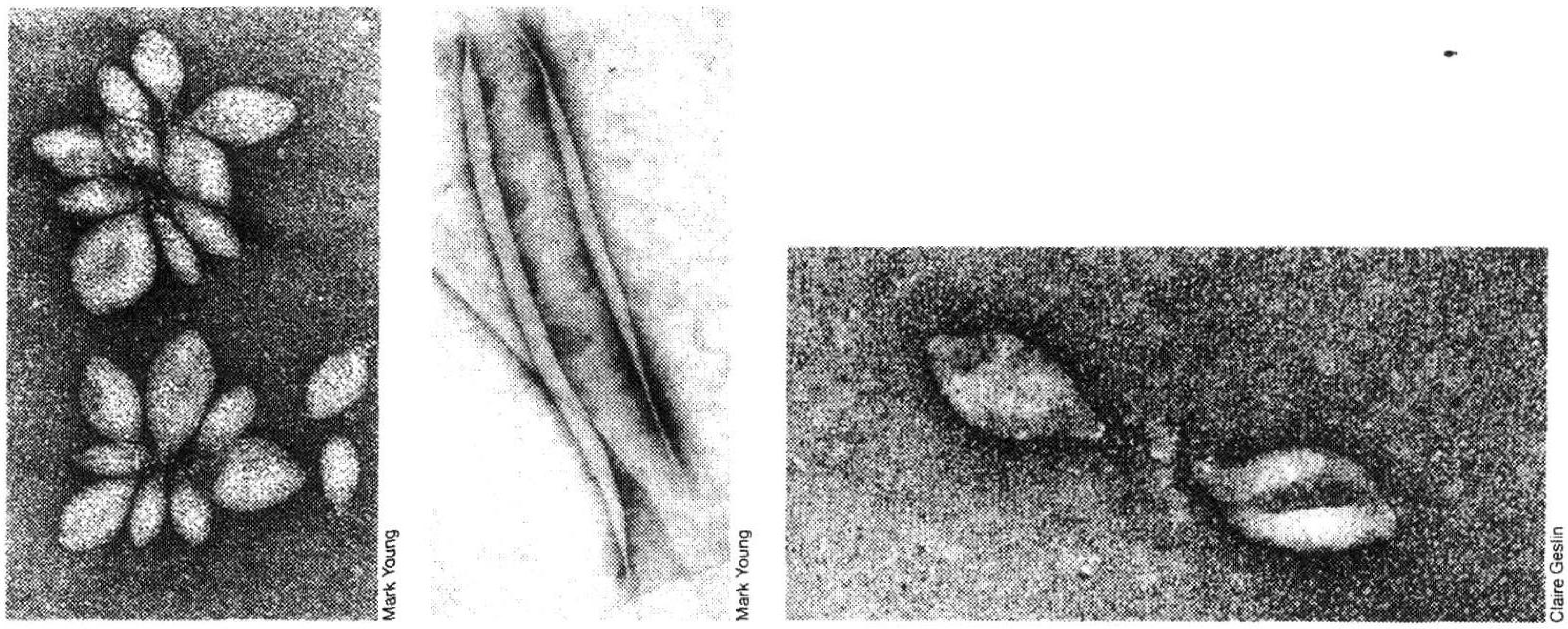
最具多样性和形态特殊性的古生菌病毒感染超嗜热菌（泉古生菌门，见第 13 章），它们将成为我们关注的焦点。超嗜热菌硫化叶菌（*Sulfolobus*）是许多形态特殊病毒的宿主。考虑到硫化叶菌生长于热、酸性土壤、温泉的生活环境（见 13.8 节），这些病毒必须能够显著地抵抗酸和热。

一种普通的名为 SSV 的感染硫化叶菌的病毒呈纺锤形，并丛生呈花团状（图 16.10a）。此种病毒广泛存在于高温环境中，并已从冰岛、日本和黄石国家公园的温泉中分离得到。SSV 的病毒颗粒包含大约 15kb 长的环状双链 DNA，明显小于如 T4 的具尾噬菌体的线性基因组（约 168kb）（细菌中尚未发现环状双链 DNA 病毒）。

硫化叶菌的第二种外形是坚硬的螺旋的棒状（图 16.10b）。这种病毒称为 SIF，它包含线性双链 DNA，长约 35kb。在病毒分类上研究了纺锤形和棒状病毒的许多变种。其中包括非常长的棒状结构，在形态上与丝状噬菌体相似（见 16.3 节），纺锤状病毒包含一个纺锤状的中心和两端的附属物（图 16.10）。迄今，未发现感染硫化叶菌（或任何古生菌）的 RNA 病毒。

纺锤形病毒同样感染火球菌（*Pyrococcus*），它属于广古生菌门（见 13.6 节）。这种病毒名为 PAV1，它与 SSV 相似，但是更大且尾部很短（图 16.10c）。噬菌体 PAV1 包含环状双链 DNA 基因组，长约 18kb，有趣的是，它的释放并不杀死宿主细胞，可能采用与丝状的 *E. coli* 噬菌体 M13 相似的出芽机制（见 16.3 节）。

火球菌是嗜热菌，其最适生长温度为 100℃，这意味着 PAV1 必须是耐热的。比较



(a) (b) (c)

图 16.10 古生菌病毒。(a, b) 电镜下的泉古生菌门病毒。(c) 广古生菌门病毒。(a) 纺锤形病毒 SSV 感染硫磺矿硫化叶菌（最适温度 80℃）。(b) 丝状病毒 SIFV 感染硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）。(c) 纺锤形病毒 PAV1 感染深海火球菌（*Pyrococcus abyssi*）（最适温度 96℃）。病毒的大小：SSV1，40nm×80nm；SIFV，50nm×900～1500nm；PAV1，80nm×120nm。除了这些形态，一些类似于有尾噬菌体的有尾病毒也能感染某些古生菌（见 9.9 节）。

PAV1 和 SSV 型病毒的基因组可知，虽然它们形态相似，但序列的相似程度极低，这说明这两种病毒在进化上没有同源性。

古生菌病毒的复制与进化

古生菌病毒的复制有待研究，以便确定基因组复制和病毒组装中的主要过程。然而，考虑到这些病毒的基因组均为双链 DNA 病毒，研究中不太可能发现复制中任何重大的新机制。然而，像复制中使用病毒而不是宿主的聚合酶及相关酶等细节有待进一步研究。鉴于古生菌病毒的基因组非常小，可以预言它们非常依赖宿主并具有如重叠基因等以提高 DNA 经济性的特征。

细菌中未发现纺锤形病毒，由于它们与细菌病毒的基因相似性非常有限，推测它们与已知的噬菌体来自不同祖先。对比之下，对结构和基因组的研究显示，具尾的古生菌病毒与细菌的相似噬菌体可能有着共同的祖先。这可能由于它们有共同的进化根源或是细菌噬菌体至古生菌病毒的横向基因转移的结果（见第 10 章）（反之亦然）。

显然，古生菌可以复制病毒。虽然病毒对其宿主的影响还不太清楚（除了可以明显看出的裂解细胞），但如果至少发现一些古生菌病毒以类似于细菌病毒的方式不影响宿主遗传都是令人惊喜的（见第 9 章）。因此，虽然还无实例，但可以预测温和病毒（见 9.10 节）与转导病毒（见 10.8 节）也存在于古生菌。

概念检查

许多病毒感染古生菌。这种病毒大多含有细菌病毒中没有的双链环状 DNA 基因组。虽然已知存在头/尾型病毒，但大多数古生菌是独特的纺锤形的。

◆ 已发现古生菌中的哪一群含有头/尾型病毒，它们与具尾细菌噬菌体有关联吗？
◆ 对比同在高温环境下生长的感染产甲烷和嗜盐古生菌病毒形态上的区别。

Ⅱ 真核生物病毒

原核细胞和真核细胞的不同对感染它们的病毒也产生了一些限制。例如，在原核生物中转录和翻译是偶联的过程。相反地，在真核生物中，转录和DNA的复制发生在细胞核中，而翻译发生在细胞质中。此外真核生物的mRNA加帽，且含有poly A尾（见14.7节和14.8节）。我们会发现这些细节与真核生物中复制的病毒相关。

在第9章中我们讨论了一些动物病毒（见9.12节）。除了它们的生物学特征，我们对它们的兴趣还来自于它们在人类疾病中的作用，在本章的剩余部分我们将着重介绍动物病毒。然而不是所有的真核生物都是动物，因此我们在这里以两种已知的植物病毒开始介绍。

16.7 植物病毒

植物细胞壁非常厚实坚硬。然而仍有许多病毒感染植物细胞，在多细胞植物中还能从被感染细胞中传播至相邻细胞。已知的植物病毒大多是正单链RNA病毒，这是由于小基因组便于完成细胞间转移的缘故。

烟草花叶病毒：一般性质

1892年，俄国科学家Dmitri Ivanovsky发现烟草花叶病的病原体可以通过过滤细菌的滤膜。1898年，荷兰微生物学家Martinus Beijerinck（见1.7节）发现此病原体不仅能透过滤膜，而且具有许多生物活体的特征。这种病原体是最早被发现的病毒，命名为烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus，TMV）。

TMV病毒颗粒呈螺旋对称（见9.2节），包含2130个拷贝的衣壳蛋白和一个拷贝的正单链RNA基因组（图9.2）。在烟草花叶病毒中首先发现RNA可作为遗传物质，如同其他病毒和细胞的DNA所起的作用。TMV仍是农业生产中的一个严重问题，因为它同样可以感染西红柿的植株。TMV感染植物需要在进入时破坏细胞壁。脱衣壳发生在细胞内。

TMV的基因组及复制

TMV的RNA基因组包含6395个核苷酸，图16.11示其基因组图谱。类似噬菌体MS2（见16.1节），TMV只编码4种蛋白质。基因组含有5′帽（见14.8节），所以它可以在植物细胞中翻译，3′端折叠成类似tRNA的结构（图16.11）。在小的RNA噬菌体中，我们看到病毒基因组也作为病毒的mRNA（见9.7节）。然而，真核细胞不能翻译多顺反子mRNA（见14.7节），所以TMV基因的表达与MS2等小噬菌体不同。

TMV第一个基因编码的MTH酶，有两种酶活性，作用于有帽结构的RNA的甲基转移酶活性和RNA解螺旋酶活性。RNP基因编码依赖于RNA的RNA聚合酶

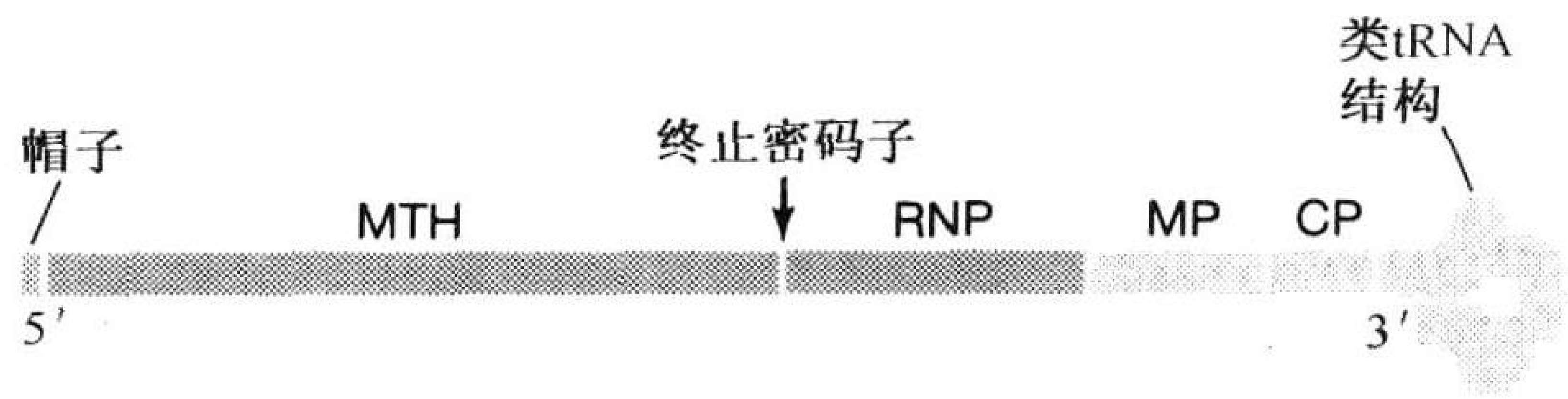


图 16.11　烟草花叶病毒的基因图。 正链 RNA 基因组 5′端加帽，3′端有 tRNA 类似结构（图中比实际比例大）。MTH 活性基因编码的蛋白质同时具有甲基转移酶和 RNA 螺旋酶活性。RNP 基因编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶，只在多聚蛋白被核糖体通读 MTH 基因的终止密码时被翻译。MP 基因编码运动蛋白，CP 基因编码衣壳蛋白。这两个蛋白质从自感染后产生的负链 RNA 合成的亚基因组 mRNA 翻译而来。除了烟草，烟草花叶病毒可以感染很多其他植物，包括番茄、胡椒、菠菜。

（RNA 复制酶），病毒必须靠它复制出负链从而产生更多的 RNA 基因组。这个蛋白质作为包括 MTH 区域的多聚蛋白的一部分被合成（见 16.8 节），而且合成只发生在核糖体偶然越过 MTH 基因的终止密码子时。这种情况并不是经常发生，这种蛋白质的生成量很低。其余两种基因分别编码运动蛋白（movement protein，MP）和衣壳蛋白（coat protein，CP）。负链 RNA 产生两种单顺反子 mRNA，每种只翻译出一种蛋白质。

类似于其他病毒的衣壳蛋白，TMV 的衣壳蛋白在组装中是必需的。颗粒在感染新植物时是非常重要的。然而，是运动蛋白使得 TMV 在被感染细胞中能够感染相邻细胞。植物细胞有一种称为胞间连丝（plasmodesmata）的结构，它能横越细胞壁从而连接植物细胞。胞间连丝的通道非常窄以至于无论 TMV 病毒颗粒或游离 RNA 都不能轻易通过。运动蛋白结合于新生成的基因组正单链 RNA，形成非常细的复合物（大约 2.5nm），这些核蛋白质复合物即可通过胞间连丝感染相邻细胞。

如前所述，已经发现许多植物正链 RNA 病毒，正单链 RNA 病毒同样存在于细菌（见 16.1 节）和动物中（见 16.8 节）。虽然这些病毒拥有不同的宿主，但基因组分析显示许多病毒是紧密联系的，并且所有的 RNA 复制酶都是有关联的。不过，由 TMV 可以看出，它们通常根据其不同的宿主在复制机制上有细微差别。

DNA 植物病毒：小球藻

绿色藻类是一类微小的绿色植物体，小球藻（*Chlorella*）是一类分布广泛的绿色藻类。大部分小球藻自由生活，但有部分小球藻可与淡水或海洋动物共生（见 14.4 节），如原生动物的草履虫。许多这种光养的内共生体能够在脱离它们居住的有机体的实验条件下生长，并且它们中的某一些是病毒的宿主；此类研究最好的例子是草履虫小球藻病毒 1（*Paramecium bursaria* chlorella virus 1，PBCV-1）。

PBCV-1 病毒的颗粒为较大的二十面体（图 16.12），基因组为双链 DNA。它的衣壳内含有一种为感染所必需的脂质成分，但是此病毒无囊膜。小球藻病毒的基因组非常大：全长超过 300kb（与其他病毒的比较见表 9.1）。在许多情况下 DNA 被甲基化修饰。PBCV-1 病毒的基因组已被测序。它长 330 742kb 的基因组编码超过 370 种蛋白质和 10 种 tRNA。基因组的末端因不完全匹配形成发夹结构（图 7.8），这点与痘病毒非常相似（见 16.13 节）。

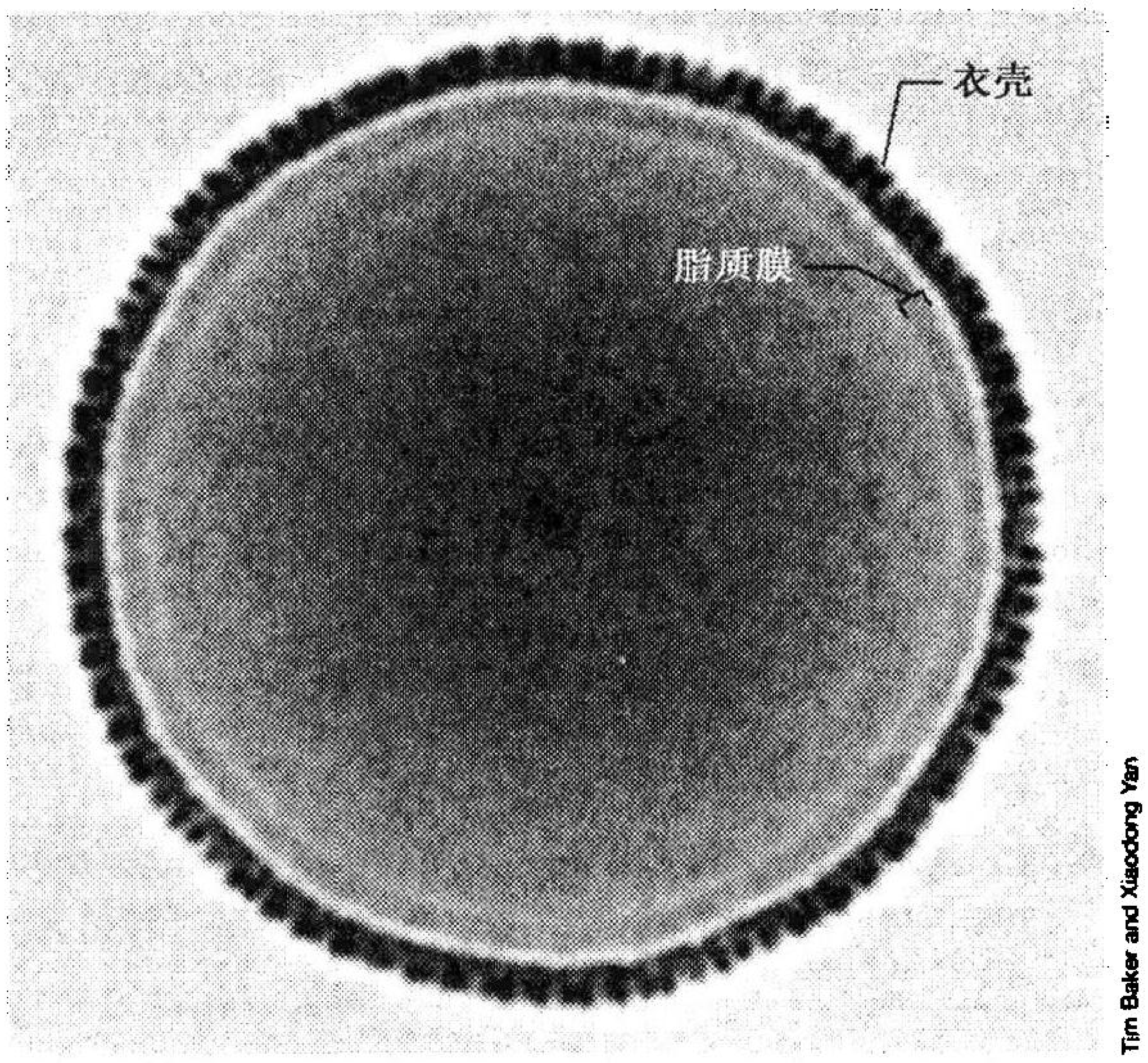


图 16.12　小球藻病毒 PBCV-1 颗粒的横切面。衣壳下可见脂双层膜。颗粒直径大约 170nm。图像由若干透射电子显微镜图片重构。小球藻是绿藻（见 14.13 节）的一种。不但体积大，小球藻病毒也含有大于 0.3Mb 的大基因组。

小球藻病毒的复制

PBCV-1 病毒入侵细胞的过程有些类似噬菌体。病毒特异性地与宿主细胞壁结合，然后由病毒携带的至少 5 种酶消化接触位点的细胞壁。病毒 DNA 释放入细胞，空的病毒颗粒被留在胞外。大部分真核双链 DNA 病毒的 DNA 复制和 RNA 合成发生在细胞核中，PBCV-1 亦是如此。PBCV-1 编码参与 DNA 复制的多种酶，其中包括 DNA 聚合酶。虽然 PBCV-1 编码一些转录因子，却不编码自身 RNA 聚合酶。PBCV-1 的基因中含有少量的内含子需要被剪切（见 7.1 节）。病毒 mRNA 需要加帽，病毒编码参与这一过程的一些酶。早期 mRNA 含有 poly A 的尾部，而晚期 mRNA 则没有。与 T4 噬菌体相似，PBCV-1 编码许多自身 tRNA。

虽然已知的 PBCV-1 的宿主小球藻只能作为共生体由其他细胞中获得，这些病毒自身却在自然界广泛存在。因此，自然界中一定存在大量的宿主。另外，小球藻病毒与其他感染藻类的病毒有关联。后者含有大的双链 DNA 基因组，但是其中许多是环状的。

小球藻病毒还有另一处非常有趣的地方：它们的基因组编码几种限制修饰酶系统（见 7.7 节和 9.9 节）。甚至，它是原核生物和少量噬菌体以外限制酶的唯一来源。因此我们在小球藻身上同时看到原核和真核的遗传因子的典型特征。

概念检查

大多数植物病毒含有正链 RNA 基因组，如第一个被发现的烟草花叶病毒（TMV）。这些病毒的基因组能够在植物中通过横越细胞壁的细胞间连接而移动。另外还发现其他植物病毒，包括含有非常大的双链 DNA 基因组的小球藻病毒。

◆ 大多数植物 RNA 病毒编码运动蛋白，它们在感染中的作用是什么？

◆ 虽然 TMV 基因组被用作信使 RNA，但并非病毒编码的所有蛋白质都能由它翻译，为什么？请解释。

◆ 小球藻病毒有哪些类似原核病毒的性质？

16.8 正链 RNA 动物病毒：脊髓灰质炎病毒和冠状病毒

一些正链 RNA 病毒引起人类及其他动物的疾病，包括导致小儿麻痹症的脊髓灰质炎病毒（poliovirus）、引起普通感冒的鼻病毒（rhinovirus）、引起呼吸系统综合征的 SARS 冠状病毒（coronavirus）及甲型肝炎病毒（hepatitis A virus）。最早被发现的能引起偶蹄类（反刍）动物衰弱并最终死亡的口蹄疫病毒也是其中的一员。除了较大一些的冠状病毒，这些病毒被统称为微小 RNA 病毒（picornavirus），因为它们都非常小（直径 30nm）（pico 的意思是“小”），且含有单链 RNA。我们这节着重研究脊髓灰质炎病毒和冠状病毒。

了解脊髓灰质炎病毒的生物特性是非常重要的，脊髓灰质炎曾经是一种主要的人类感染性疾病，但是有效疫苗的研制使其几乎完全受到了控制（见 22.13 节）。世界卫生组织（WHO）已经启用了在世界范围内根除该疾病的疫苗工程。目前，根据报道，该病毒只存在于非洲少数国家及印度次大陆。

脊髓灰质炎病毒的复制：一般性质

病毒粒子有着简单的二十面体结构，每个粒子有 60 个形态学单位，每个单位由 4 种不同的蛋白质组成（图 16.13a）。脊髓灰质炎病毒的 RNA 是单链线性分子，长约 7440 个碱基（表 9.1）。病毒 RNA 的 5′端是一种蛋白质，称为 VPg 蛋白，与 RNA 共价结合。3′端是 poly A 尾巴。

图 16.13b 示脊髓灰质炎病毒增殖的概况。病毒 RNA 直接被当作信使 RNA。有趣的是尽管其 RNA 没有真核细胞翻译中视为前提条件的帽结构，它仍然可被用作 mRNA（见 14.8 节）。RNA 5′端有一个长序列，能够折叠成茎环结构，VPg 蛋白和茎环结构模拟了帽结合复合物，允许脊髓灰质炎病毒 mRNA 结合于核糖体上。病毒 RNA 是单顺反子，但是将所有蛋白质编码在一个多聚蛋白（polyprotein）中，多聚蛋白再被切割成单个蛋白质。整个复制过程在细胞质中进行。

感染初期，病毒粒子与敏感细胞上的特异受体吸附并进入细胞。进入细胞后发生脱壳，释放出的 RNA 与核糖体结合，从一个单一起始密码子开始，病毒 RNA 被翻译成一个较大的多聚蛋白（大约 2200 个氨基酸），然后自我剪切成 20 个小蛋白质（包括剪切的中间体），其中包括 4 种不同的结构蛋白，它们是与 RNA 相连的 VPg 蛋白、负责负链和正链 RNA 合成的 RNA 聚合酶及至少一种病毒编码的蛋白酶（其行使剪切功能）。这一切割叫做翻译后切割，如同动物细胞中的正常代谢一样，发生在大多数的动物病毒中。

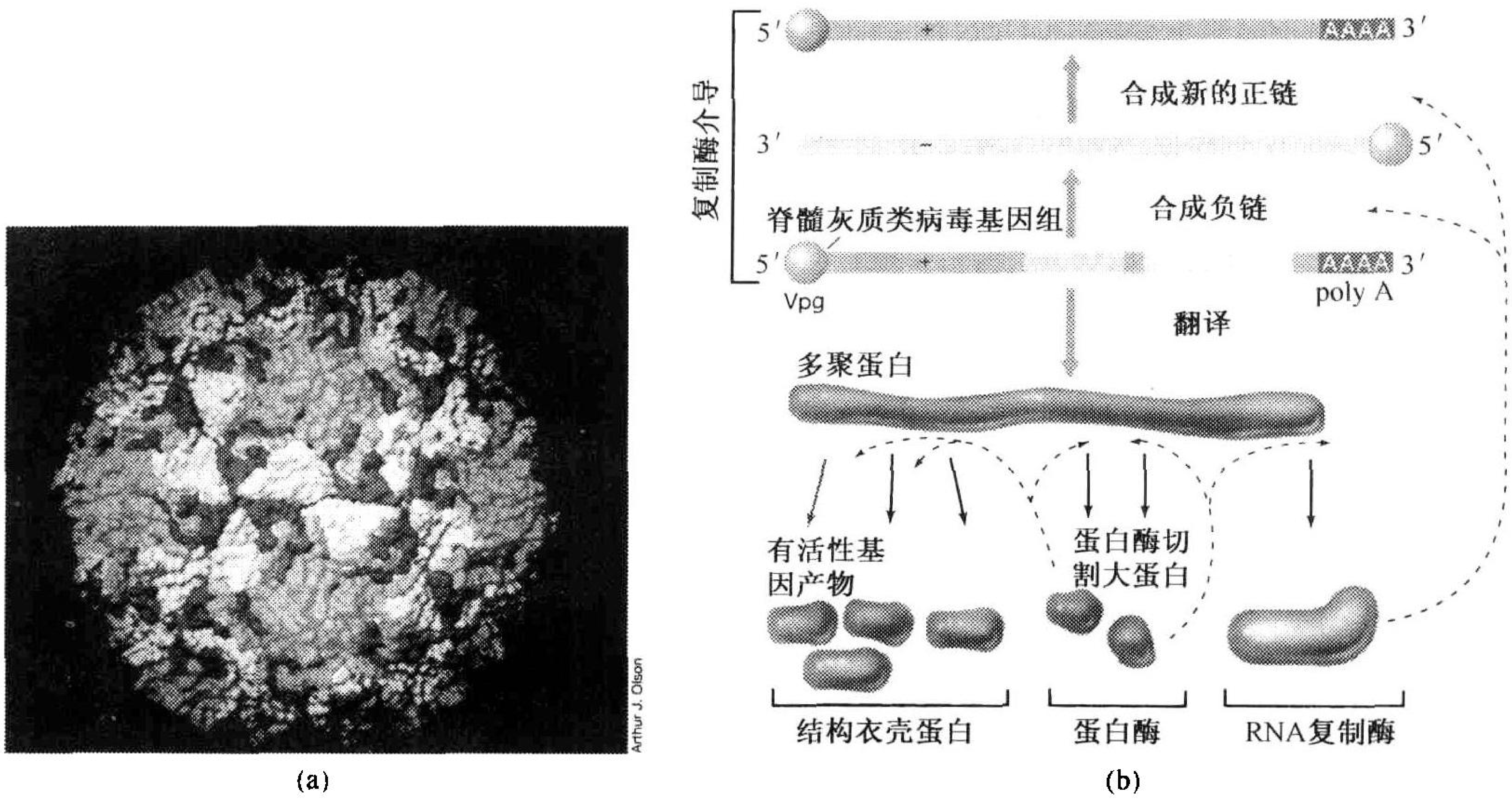


图 16.13 脊髓灰质炎病毒。（a）基于电子衍射分析脊髓灰质炎病毒颗粒的计算机模型，不同的结构蛋白由不同颜色表示。（b）脊髓灰质炎病毒的复制，病毒的单链 RNA 作为 mRNA 可直接被翻译，产物是一个大的蛋白质分子。这个蛋白质经过切割形成有活性的病毒蛋白，包括结构衣壳蛋白和负责脊髓灰质炎病毒 RNA 复制的 RNA 聚合酶。然后衣壳蛋白分子和 RNA 装配成完整的脊髓灰质炎病毒。从 mRNA 翻译出一个多聚蛋白之后再切割是常被其他病毒采用的策略（见 16.15 节）。

脊髓灰质炎病毒 RNA 的复制

在感染后的很短时间内病毒 RNA 的复制就开始了，并由依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（复制酶）催化。复制酶可以将病毒的正链 RNA 转变为负链 RNA，负链 RNA 同样可被病毒特异性 RNA 复制酶再次用作模板合成子代正链。一些子代正链又被合成负链，最后细胞中将出现 1000 多个负链，由此将产生上百万个正链。所有的正链与负链都会和小的 VPg 蛋白共价结合（VPg 只有 22 个氨基酸长度），它可以作为转录的引物。

当病毒的复制开始时，宿主 RNA 和蛋白质的合成就被抑制，这是因为宿主中的帽结合蛋白被破坏了，这种蛋白质是翻译有帽子的 mRNA 时所必需的（见 14.8 节）。脊髓灰质炎病毒克服此限制，如前面提到的通过基因组 5′端形成的二级结构促进与核糖体结合。

冠状病毒和 SARS

冠状病毒是正单链 RNA 病毒，与脊髓灰质炎病毒类似，其复制在细胞质中进行，但是在大小和复制细节上存在差异。冠状病毒引起人类和其他动物的多种呼吸感染，其中 15%为普通感冒（见 26.8 节）。2003 年，冠状病毒引发了严重急性呼吸道综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS），可使人类呼吸道引发致命的肺炎（见 25.8 节）。

冠状病毒是具囊膜的近球形结构，直径为 60～220nm，表面穿插球形糖蛋白，这些使它看起来像个王冠（corona 是拉丁文王冠之意）（图 16.14，图 25.9）。冠状病毒基因组引人注目是因为它是已知 RNA 病毒中最大的（27～31kb，SARS 病毒平均 29 700 个核苷酸）。

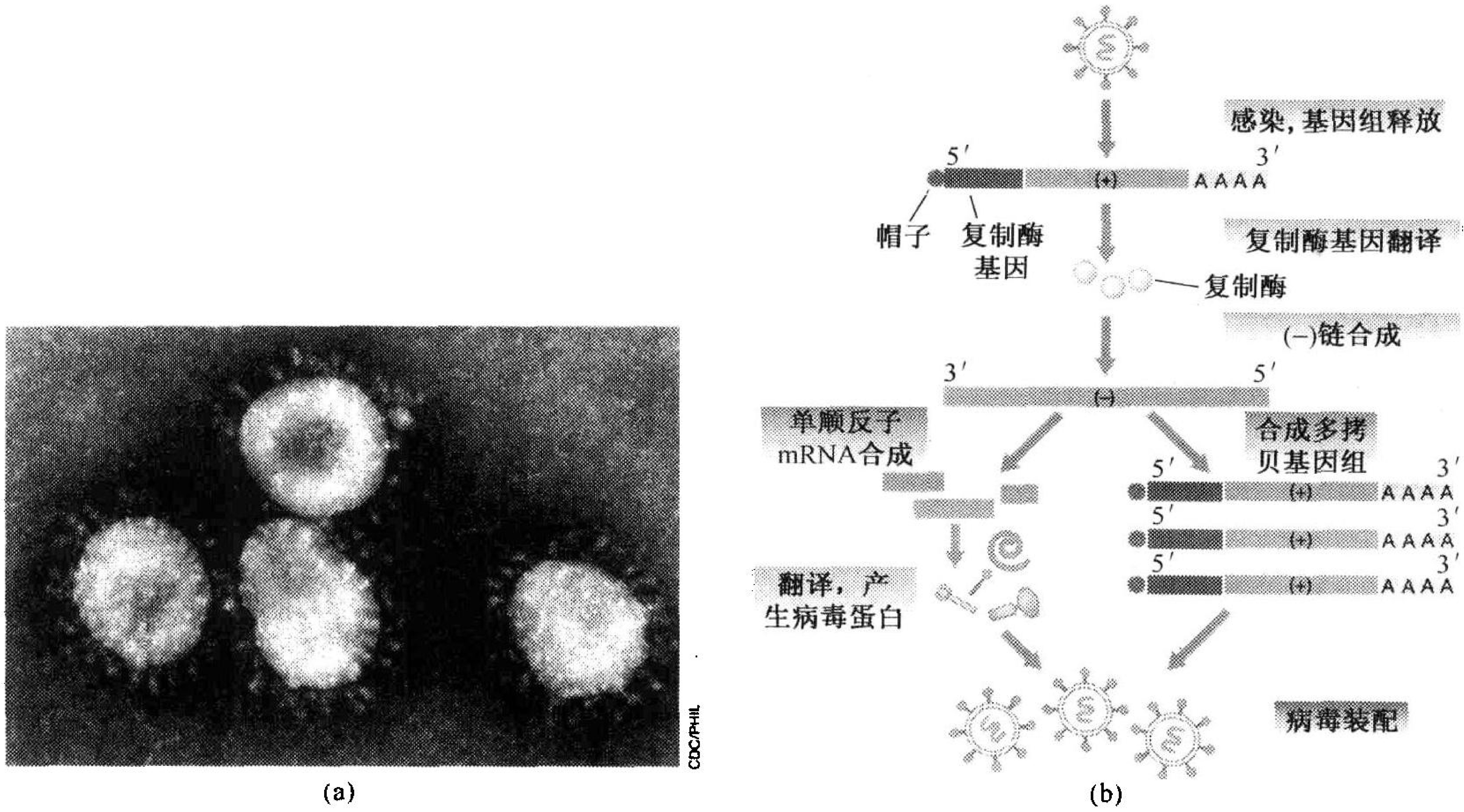


图 16.14 冠状病毒。（a）冠状病毒的电子显微镜图片。（b）冠状病毒的复制步骤。mRNA 编码病毒蛋白事件只发生在复制酶从病毒基因组转录出负链 RNA 之后。

冠状病毒拥有甲基化的 5′帽和 3′poly A 尾，所以在动物细胞中能直接行使 mRNA 的功能，然而，许多蛋白质不能由基因组 RNA 翻译得来，感染时只从基因组翻译出病毒 RNA 复制酶，复制酶以基因组 RNA 为模板产生全长负链 RNA，从而转录出许多单顺反子 mRNA，而后翻译产生病毒蛋白，后代基因组同样由负链 RNA 转录得来。病毒组装发生在真核细胞的主要分泌细胞器高尔基体上（见 14.5 节），装配好的病毒被释放到细胞表面。

冠状病毒在病毒大小、基因组大小和帽结构上有别于脊髓灰质炎病毒，它缺少 VPg 蛋白和多聚蛋白的形成及其剪切。然而，与脊髓灰质炎病毒相似的是，冠状病毒也能引起严重疾病，其中包括脊髓灰质炎中少见的重度急性感染。SARS 的致死率在 60 岁以下人群为 13%，超过 60 岁人群为 45%（见 25.8 节）。

概念检查

小 RNA 病毒如脊髓灰质炎病毒，其 RNA 能直接作为信使 RNA 产生一个长的多聚蛋白，再被酶降解为多个小蛋白质。这些小蛋白质对于核酸的复制和病毒的装配是必需的。冠状病毒是大单链 RNA 病毒，它在复制特性上部分有别于脊髓灰质炎病毒。

◆ 为什么脊髓灰质炎病毒的 RNA 可以在细胞质中合成，而宿主 RNA 必须在细胞核中合成？

◆ 脊髓灰质炎病毒和 SARS 病毒在蛋白质合成和基因复制途径上有何异同？

16.9 负链 RNA 动物病毒：狂犬病毒、流感病毒及相关病毒

脊髓灰质炎病毒和冠状病毒的复制需要正链基因组转录得到的负链作为中介，完成新的正链的合成。然而，许多 RNA 动物病毒自身为负链 RNA（minus-strand RNA），这类病毒被称作负链 RNA 病毒（negative-strand virus）。我们在这里讲述两种重要的 RNA 病毒：弹状病毒（rhabdovirus）[如狂犬病病毒（rabies virus）] 和正黏病毒（orthomyxovirus）[如流感病毒（influenza virus）]。埃博拉病毒（Ebola virus）是一种引起人类新出现的传染性疾病的病原体（见 25.10 节），也是一种负链 RNA 病毒。尚未发现负链 RNA 噬菌体或古生菌病毒。

弹状病毒：一般性质

负链 RNA 病毒中最重要的人类病原体是狂犬病病毒，能引起动物和人的狂犬病。世界范围内，每年有超过 30 000 例的狂犬病（大多为致死的）发生在人类身上，更发生在难以计数的家畜及野生动物身上（见 27.1 节）。狂犬病毒被称为弹状病毒，因为病毒粒子的形状是子弹状的。另一种研究较为深入的弹状病毒是水泡性口炎病毒（vesicular stomatitis，VSV）（图 16.15），能引起牛、猪、马有时也引起人的水泡性口炎，许多弹状病毒，如马铃薯黄矮病病毒（potato yellow dwarf virus）既感染昆虫也感染植物，导致严重的农业病害。

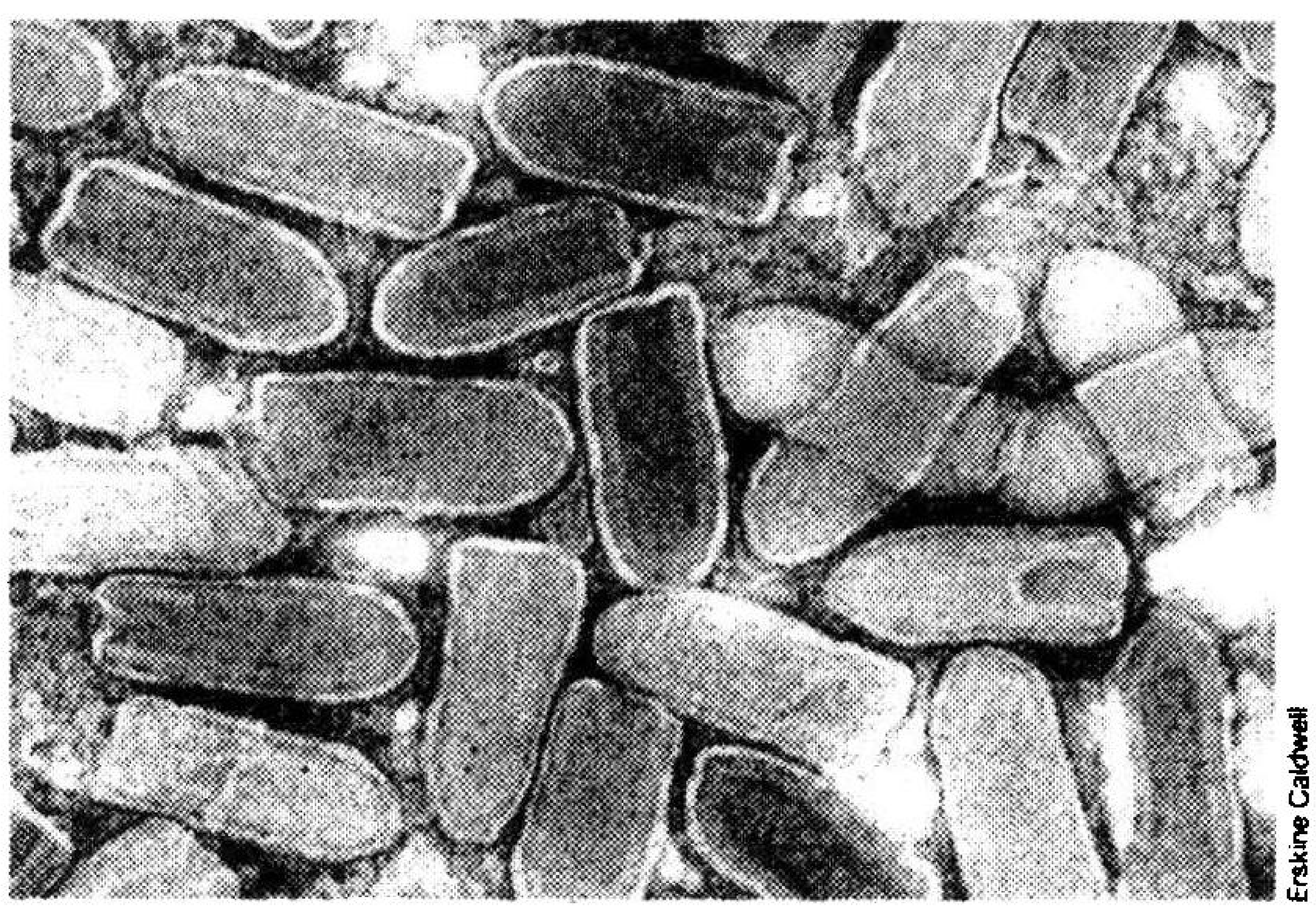


图 16.15　弹状病毒（水泡性口膜炎病毒）的电子显微镜图片。颗粒直径约 65nm。弹状病毒还包括狂犬病病毒。狂犬病在 27.1 节讨论。

弹状病毒是有囊膜的病毒。在核衣壳外包裹着比较复杂的脂质膜。弹状病毒颗粒是子弹状的，直径 70nm，长 175nm（图 16.15）。

核衣壳呈螺旋状对称，只占病毒粒子总重量的很小一部分（病毒粒子的 2%～3% 是 RNA）。

弹状病毒的复制

病毒粒子中带有一些感染过程所需要的酶：其一为依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（一种 RNA 复制酶），如 9.7 节。此酶是必需的，因为负链基因组不能直接翻译而必须转变为互补的正链，而宿主细胞中不存在从 RNA 转录出 RNA 的酶。

弹状病毒的 RNA 在细胞质中被转录成两种不同类型的 RNA（图 16.16）。第一种为编码病毒结构基因的一系列 mRNA（如 VSV 有 5 个基因），每个 mRNA 都是单顺反子，编码单一蛋白质。第二种是产生完整病毒基因组的一个正链 RNA 拷贝（VSV 基因组长度是 11 162 个核苷酸），这些正链 RNA 再作为模板被合成出新的子代病毒粒子中的负链 RNA 分子。一旦早期转录中编码病毒 RNA 聚合酶的 mRNA 被合成出来，病毒的 RNA 聚合酶就开始合成，从而导致许多正链 RNA 分子的形成，既包括信使 RNA 也包括全长基因组 RNA 模板（图 16.16）。

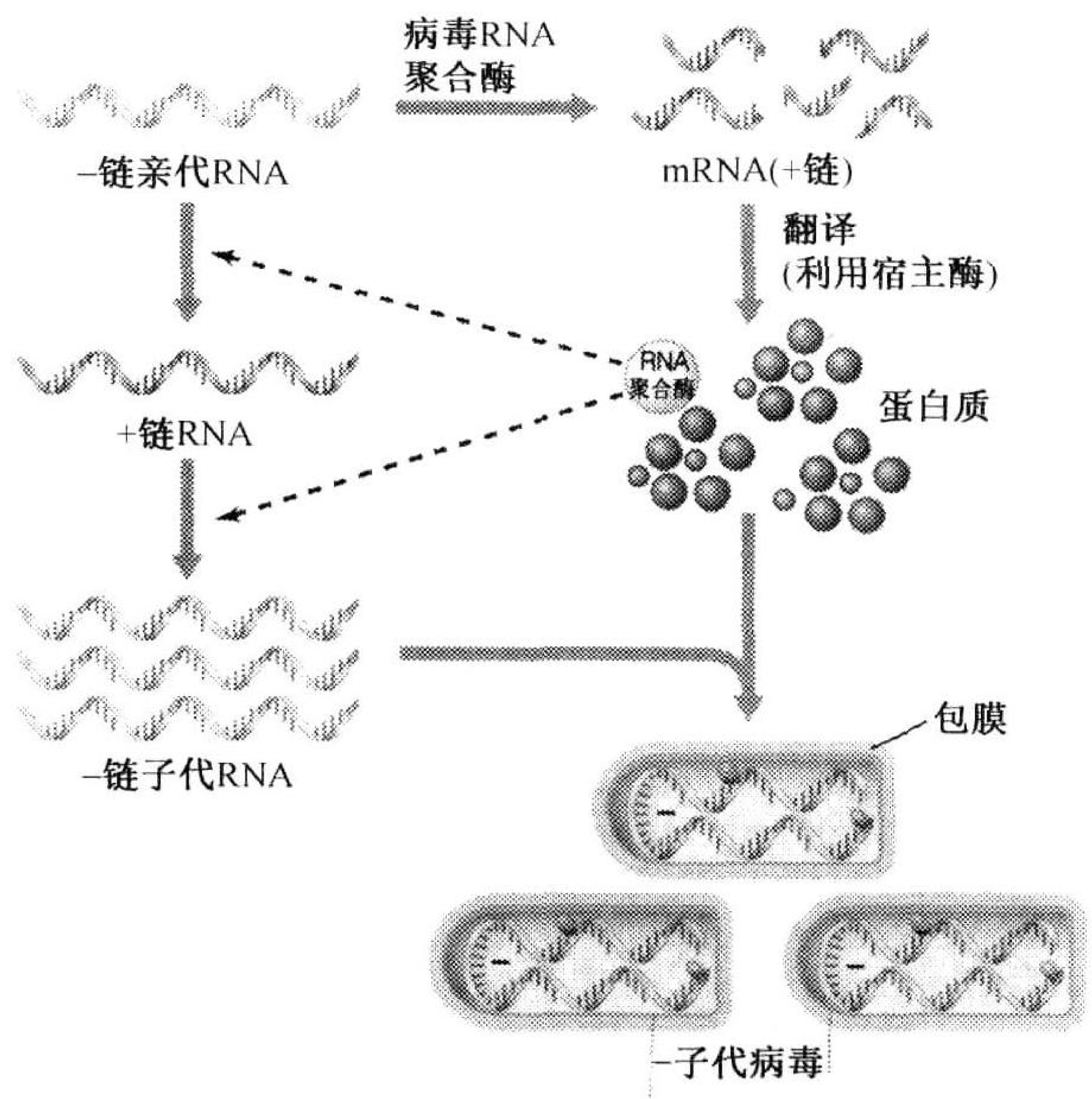


图 16.16　负链 RNA 病毒的增殖过程。注意颗粒中携带病毒 RNA 聚合酶的重要性。因为动物细胞不能从 RNA 模板复制 RNA，所以这点很关键。

弹状病毒的组装

mRNA 的翻译导致病毒衣壳蛋白的合成。有囊膜病毒的装配比简单病毒粒子要复杂得多。需要形成两类蛋白质：核衣壳蛋白（nucleocapsid protein）和囊膜蛋白（envelope protein）。核衣壳蛋白分子首先与病毒 RNA 结合，形成核衣壳（nucleocapsid）。

囊膜蛋白的 N 端具有疏水氨基酸引导序列（见 7.16 节）。当这些蛋白质被合成以后，糖链基团再加上去，形成糖蛋白。这些糖蛋白被转运到细胞质膜上，引导序列被去除，并且置换宿主细胞膜上的蛋白质。当核衣壳移动到镶嵌有病毒特异糖蛋白的质膜位

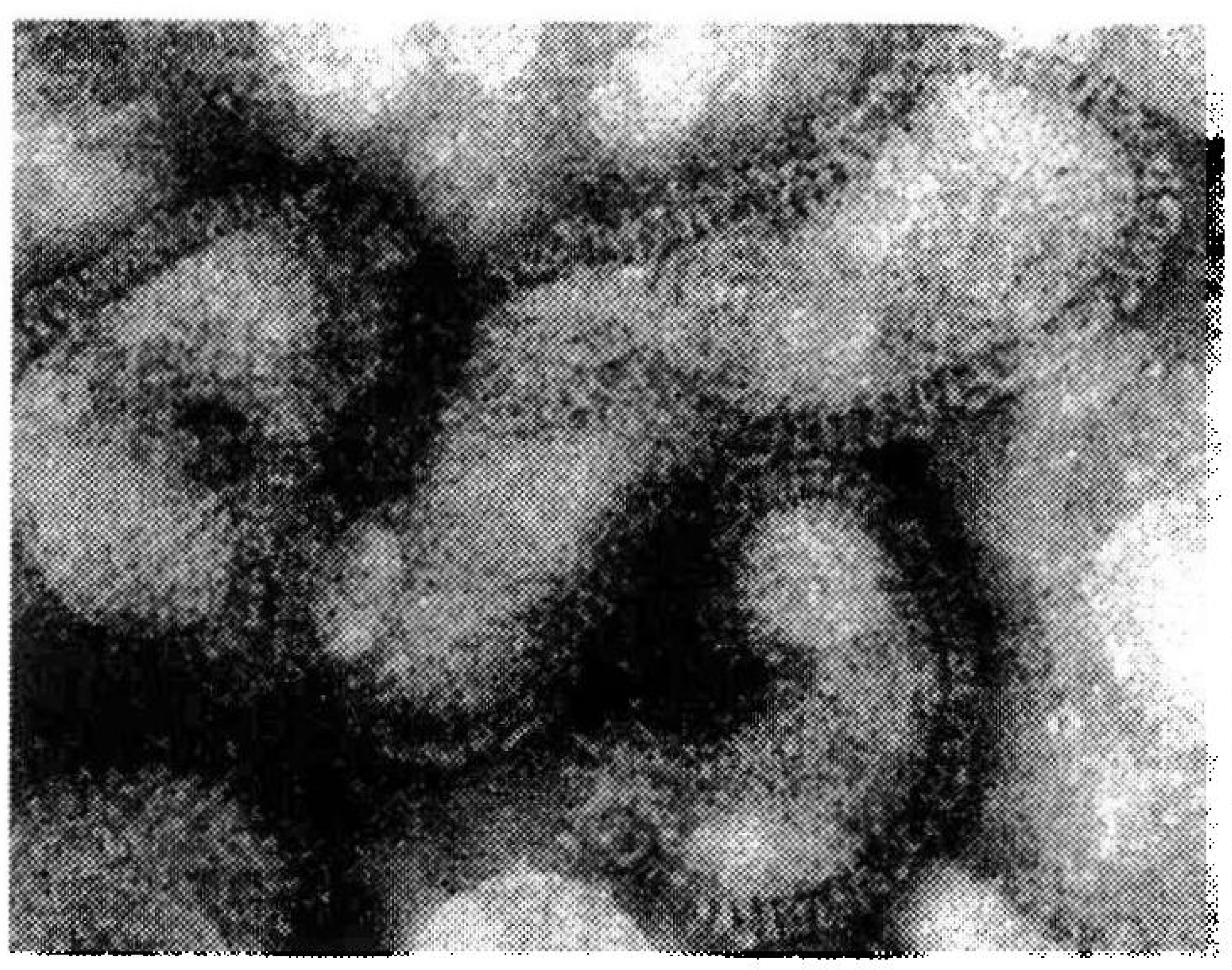
置时，能够特异地识别这些糖蛋白。核衣壳与糖蛋白一起以出芽的方式释放出来，在这个过程中形成有糖蛋白囊膜的病毒粒子。

最终，有囊膜的病毒粒子由囊膜包裹着核衣壳，其中，囊膜的脂质来自宿主细胞，而糖蛋白则由病毒编码。出芽过程本身不对细胞产生可检测的损害，细胞能够在一个相当长的时间内连续地释放病毒颗粒，但宿主细胞损害最终仍会发生，不过这不是仅仅因为病毒释放造成，还有一些未知因素共同作用。

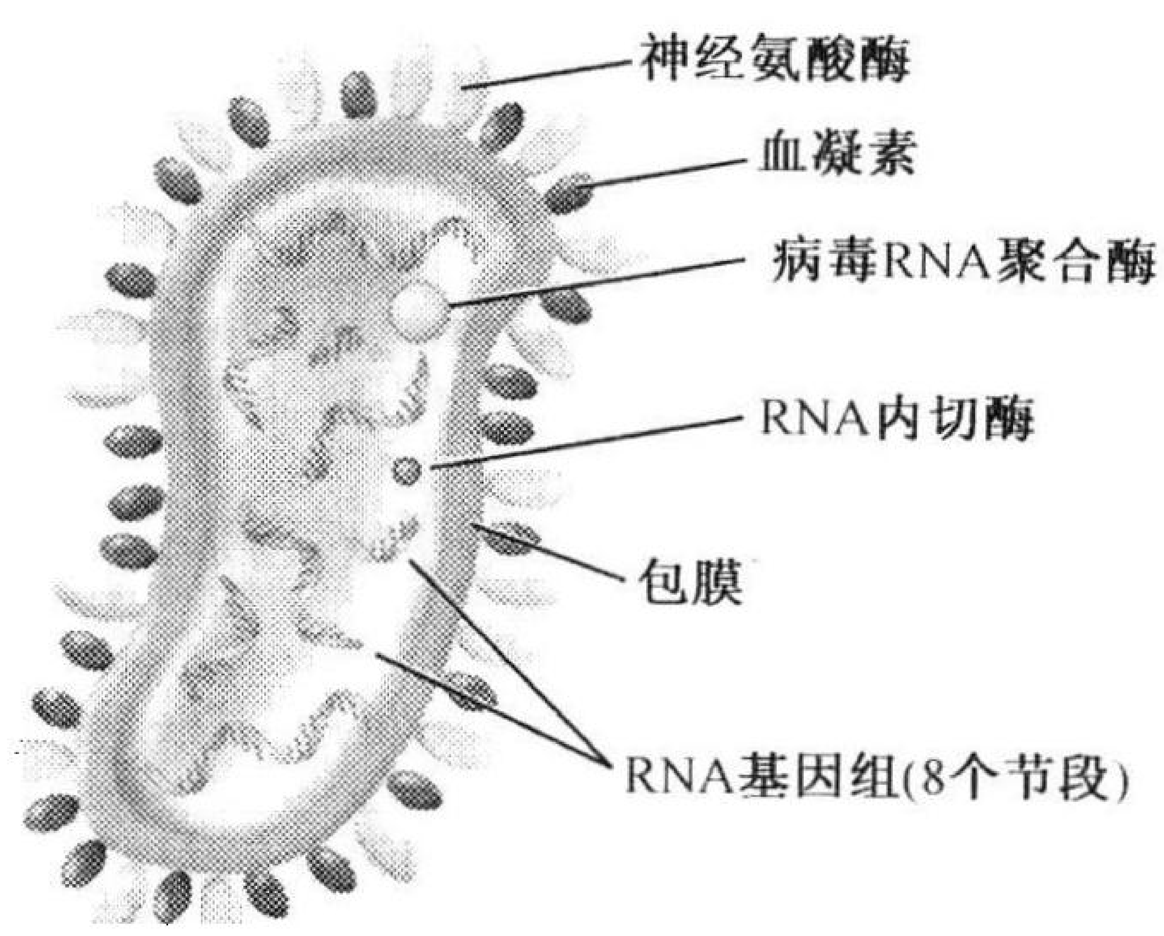
流感病毒和其他正黏病毒

另一类重要的负链病毒是正黏病毒（orthomyxovirus），包括人的流感病毒。"myxo" 的意思是病毒与细胞表面的黏液层相互作用（见 26.8 节）。流感病毒主要是与呼吸道黏膜相互作用。"orth" 与另一类负链病毒"副黏病毒"（paramyxovirus）相区分。副黏病毒的分子生物学与弹状病毒极为相似，包括引起人的流行性腮腺炎和麻疹的病毒（见 26.7 节）。

对正黏病毒的研究人们已经进行了许多年，最早开始于 1918 年世界范围的流感暴发（见 26.8 节）。正黏病毒是有囊膜的病毒，基因组 RNA 分成几个节段，称为分节段的基因组（segmented genome）。A 型流感病毒的基因组分 8 个节段，每段都是线性单链分子，大小为 890～2341nt。流感病毒的核衣壳是螺旋对称的，直径 6～9nm、长 60nm。核衣壳被包裹在囊膜中，囊膜上有许多病毒特有的蛋白质，而脂质来自宿主细胞（图 16.17a）。



(a)



(b)

图 16.17　流感病毒。 (a) 人流感病毒颗粒的电子显微镜照片。(b) 模式图，表示一些组分，包括分节段的基因组。流感病毒在 26.8 节讨论。

由于流感病毒以出芽的方式离开细胞，病毒没有固定的形状，称为多形性（图 16.17a）。囊膜外的刺突能与宿主细胞表面发生作用。有一种刺突称为血凝素（hemagglutinin），因为它能引起红细胞的凝集。红细胞并不是流感病毒正常侵染的宿主细胞，但它的表面也含有呼吸道黏膜所具有的特征组分唾液酸。因此，红细胞是测定凝集能力的合适的细胞种类。流感病毒血凝素的重要特征是血凝素的抗体能阻断病毒感染细胞。因此，抗血凝素的抗体能中和病毒。这就是对流感产生免疫的机制（见 22.13 节和 26.8 节）。

病毒表面第二种类型刺突是神经氨酸酶（neuraminidase）（图 26.19）。神经氨酸酶降解细胞膜表面的唾液酸组分，唾液酸是神经氨酸的衍生物。神经氨酸酶最初的功能是在病毒装配过程中破坏细胞膜上的唾液酸，否则，唾液酸会阻碍装配或被掺入到成熟的病毒粒子中。

流感病毒的复制

除了神经氨酸酶，病毒还含有另外两种酶：依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RNA 复制酶），能将负链转换为正链（已在弹状病毒中讨论过）；还有一种 RNA 内切酶，能切除宿主有帽子结构的 mRNA 前体上的引物。病毒粒子通过内吞作用进入细胞。进入细胞质后，核衣壳与囊膜分离，并且移动到细胞核。病毒核酸的复制发生在细胞核中。

脱衣壳作用激活了病毒的 RNA 聚合酶。于是病毒 RNA 在细胞核内被转录成 mRNA分子，所使用引物是从新合成的、有帽子结构的细胞 mRNA 5′端切除下来的寡核苷酸，所以病毒 mRNA 是有 5′帽结构的。病毒 mRNA 再加上 poly A 尾巴，然后转移到细胞质中进行翻译。不分段流感病毒的 RNA 在细胞核中复制，而蛋白质则是在细胞质中合成的。

8 个基因组片段编码 10 种病毒蛋白质。从第 1 到第 6 个片段转录出的 mRNA 每段编码 1 种蛋白质，而另外两段分别编码两种蛋白质。但这并不是通过原核生物中那种多顺反子 mRNA 来实现的，因为真核生物核糖体只识别 mRNA 5′端的 AUG 起始密码子（见 7.16 节）。它们从 RNA 只能产生一种蛋白质。从第 7 和第 8 片段转录出的全长 mRNA 分别只能翻译出一种蛋白质，而这两段 mRNA 再经过宿主 RNA 剪切机制的加工后才能翻译出另外的蛋白质。就像重叠基因一样（见 16.2 节）。这是 RNA 病毒最大限度地利用它们的小基因组的又一种方式。

一些蛋白质参与流感病毒 RNA 的复制，另外一些是病毒粒子的结构蛋白。整个病毒 RNA 合成的策略与弹状病毒相似，首先转录出正链模板，然后再形成子代负链分子。以一种出芽方式形成完整的有囊膜的病毒粒子，这个过程与弹状病毒很相似。

流感病毒抗原性转变/漂移

流感病毒的节段基因组有着重要的实际意义。流感病毒及这个科的其他病毒具有一种现象叫做抗原性转变（antigen shift），即两个基因组有差异的品系感染同一个细胞时，RNA 基因组的一些片段会连在一起。后代病毒的表面蛋白与其亲本相比发生重大变化，表面蛋白是人工免疫或自然感染所致的抗体的主要靶标（见 22.13 节）。然而，当抗原性转变发生后，先前对流感病毒的免疫不能抵挡新病毒的感染，抗原性转变导致流感病毒的大规模流行，因为人群中缺乏对这种新型病毒的免疫能力（见 26.8 节）。

抗原性漂移与抗原性转变相比，可使流感病毒表面神经氨酸苷酸和红细胞凝聚素发生变化，但通常只有很小一部分，是由编码其基因的变异引起的，表面表征的改变使得抗体对其识别作用降低甚至消失。因此，必须产生新的抗体才能发挥有效的免疫作用，这就是为何流感病毒疫苗不能跨年使用的原因所在（见 26.8 节）。抗原性漂移产生新病毒型，因此需要新的病毒疫苗。

概念检查

负链RNA病毒的基因组不能直接用作信使RNA，但能通过病毒粒子中存在的依赖于RNA的RNA聚合酶转录为mRNA。重要的负黏病毒包括流感病毒和狂犬病毒。

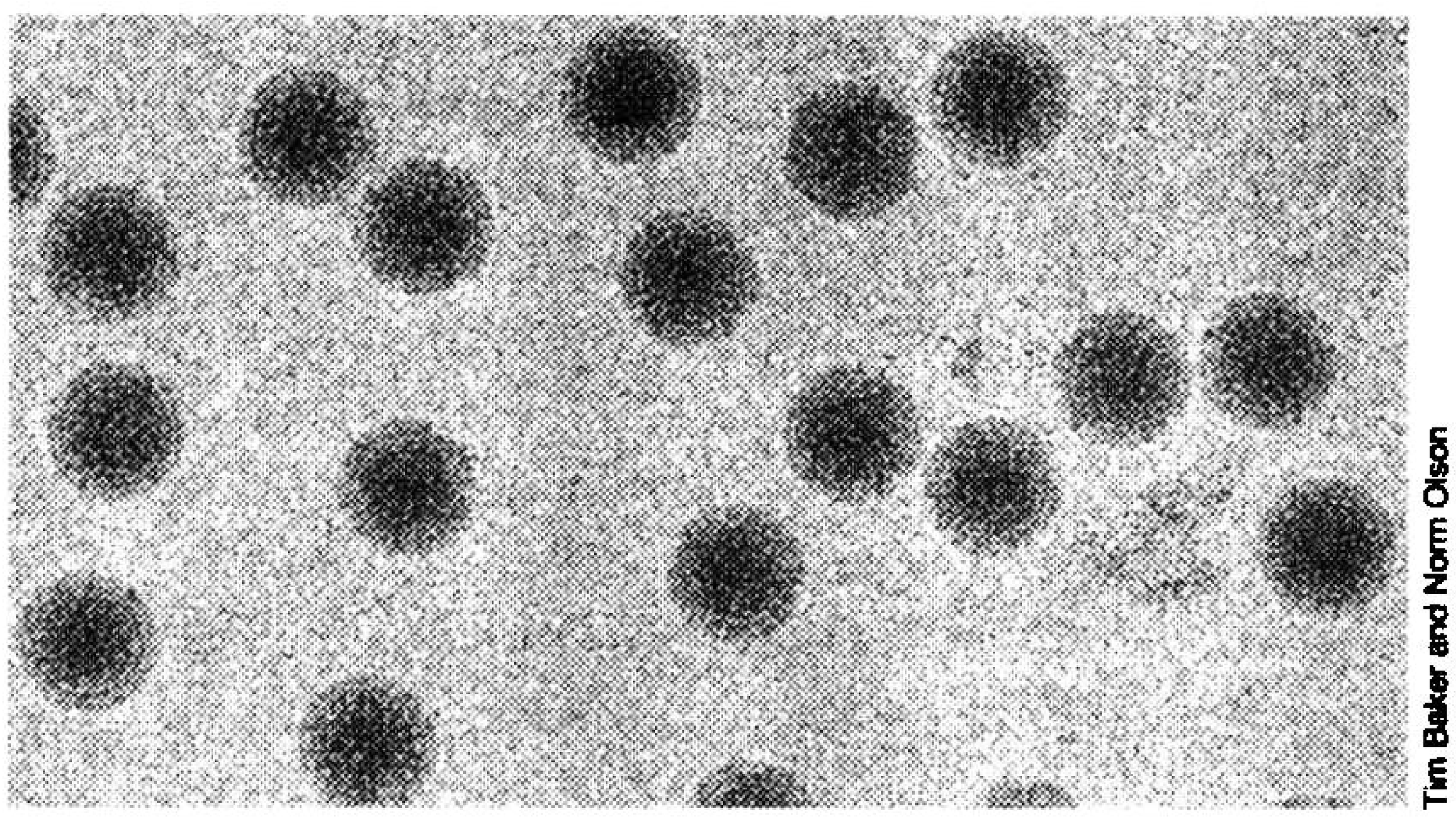
◆ 负黏病毒粒子中为何必须携带酶?

◆ 什么是节段基因组?

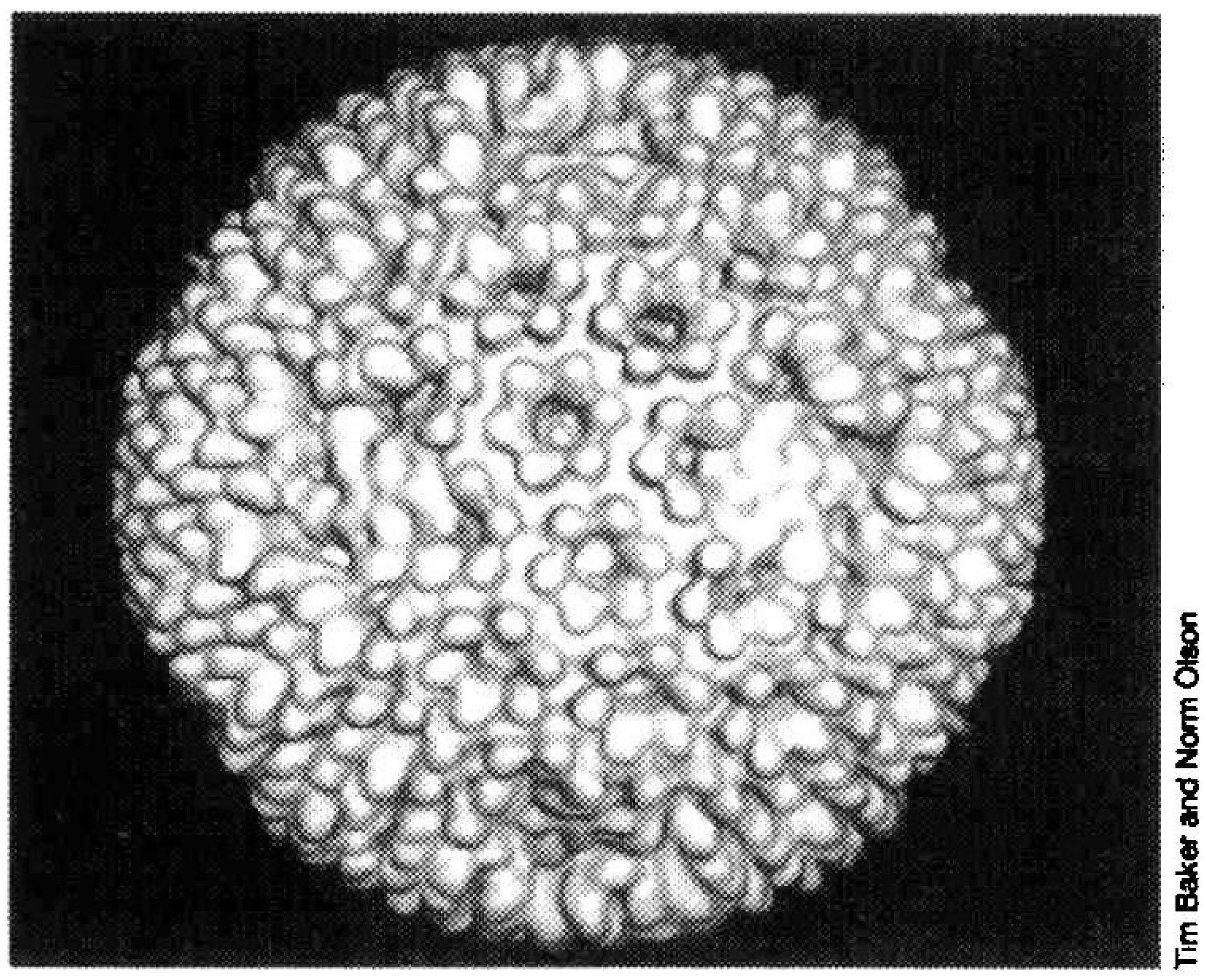
◆ 抗原性转变和抗原性漂移有何不同?

16.10 双链RNA病毒：呼肠孤病毒

呼肠孤病毒（reovirus）是一种重要的动物病毒，具有双链RNA基因组。呼肠孤病毒的一个更重要的属是轮状病毒属（*Rotavirus*），能引起6～24个月的婴幼儿严重的腹泻。已知呼肠孤病毒能感染呼吸道和植物，与先前提到的Φ6噬菌体似乎很相似（见16.1节）。呼肠孤病毒粒子是无囊膜的核衣壳结构，直径为60～80nm，有二十面体对称的双层衣壳（图16.18）。可以预言，这些双链RNA病毒粒子中含有合成mRNA和新RNA基因组所必需的酶。



(a)



(b)

图16.18　双链RNA病毒：呼肠孤病毒。（a）显示若干呼肠孤病毒颗粒的电子显微镜图片（颗粒直径约70nm）。（b）由冰冻水合病毒的电子显微镜照片重构的呼肠孤病毒三维图。

呼肠孤病毒的复制

呼肠孤病毒的基因组也较为独特，有10～12个双链线性RNA分子。复制发生在宿主细胞质中。双链RNA不具有mRNA活性，因此复制的第一步是使用病毒编码的依赖于RNA的RNA聚合酶将负链作为模板合成正链，mRNA而后经加帽和甲基化最终进行翻译。

通常，每个RNA分子编码单一的蛋白质，少数情况下蛋白质需要被剪切形成最终的产物。不过，有一种mRNA分子的确编码两种蛋白质，并且RNA没有被修饰过。

很明显，核糖体有时错过了第一个基因上的起始密码子，而移动到第 2 个基因的起始密码子。因此，真核核糖体翻译起始于 mRNA 上第一个 AUG 并不是绝对的。

在感染初期，病毒粒子和细胞上的受体蛋白质结合，发生吸附，病毒进入细胞后，转运到溶酶体（见 14.5 节），在酶的作用下去除外层衣壳。这种脱衣壳作用激活了病毒粒子中的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶，从而起始病毒的复制过程。

呼肠孤病毒在亚病毒颗粒中，即病毒的核心里面进行复制，这个核心在细胞中没有被破坏。每 10 个有帽的单链正链 RNA 被组装成双链 RNA 合成体。以有帽的单链正链 RNA 作为模板合成子代负链基因组 RNA，然后释放出子代双链病毒 RNA，它们再被壳体化。当足够的病毒衣壳蛋白存在时，就能装配出成熟的粒子并通过细胞裂解释放出来。

概念检查

呼肠孤病毒含有节段的双链 RNA 基因组，呼肠孤病毒像负链 RNA 病毒一样，含有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。

◆ 呼肠孤病毒与流感病毒在复制上的异同？

16.11 双链 DNA 动物病毒的复制

已知的大量动物双链 DNA 病毒中，很多可以感染人类，其中包括多瘤病毒（polyomavirus)、乳头瘤病毒（papilloma virus)、疱疹病毒（herpesvirus)、痘病毒（pox virus）和腺病毒（adenovirus)。除痘病毒在细胞质中进行复制较为特殊以外，其他都是在细胞核中进行复制，接下来我们简单讨论每种病毒的复制。

多瘤病毒：SV40

一些多瘤病毒（polyomavirus）能够诱发动物肿瘤，oma 意为肿瘤。其中一种 DNA 肿瘤病毒最早是从猿猴体内分离出来的，称为猿猴病毒 40 或 SV40。SV40 病毒是利用基因工程技术研究得较早的遗传因子，也被广泛用作载体将基因转入到真核细胞中（见 31.4 节)。

SV40 病毒粒子的结构简单，由 72 种蛋白质亚单位构成二十面体的头部，直径为 45nm，没有被膜。与 RNA 病毒不同的是，病毒粒子中没有酶。SV40 的基因组是一个双链 DNA 分子，5243bp，DNA 呈环状（图 16.19），在病毒粒子中呈超螺旋构型。SV40 基因组的完整序列已被测定，基因图谱如图 16.20。

SV40 的核酸在细胞核中合成，而蛋白质在细胞质中合成。最后在细胞核中装配病毒粒子。病毒的复制分为两个阶段：早期和晚期。早期转录的是病毒 DNA 上的早期区域（图 16.20)。在细胞 RNA 聚合酶的作用下转录出初级产物，再被剪切为一大一小两种 mRNA，SV40 基因组内部有内含子，因此它们被从转录的初级产物中切除。然后这些 mRNA 在细胞质内被加帽翻译成两种蛋白质。其中一种是 T 抗原，可与亲本 DNA 上的复制起始点结合，起始病毒基因组的合成。

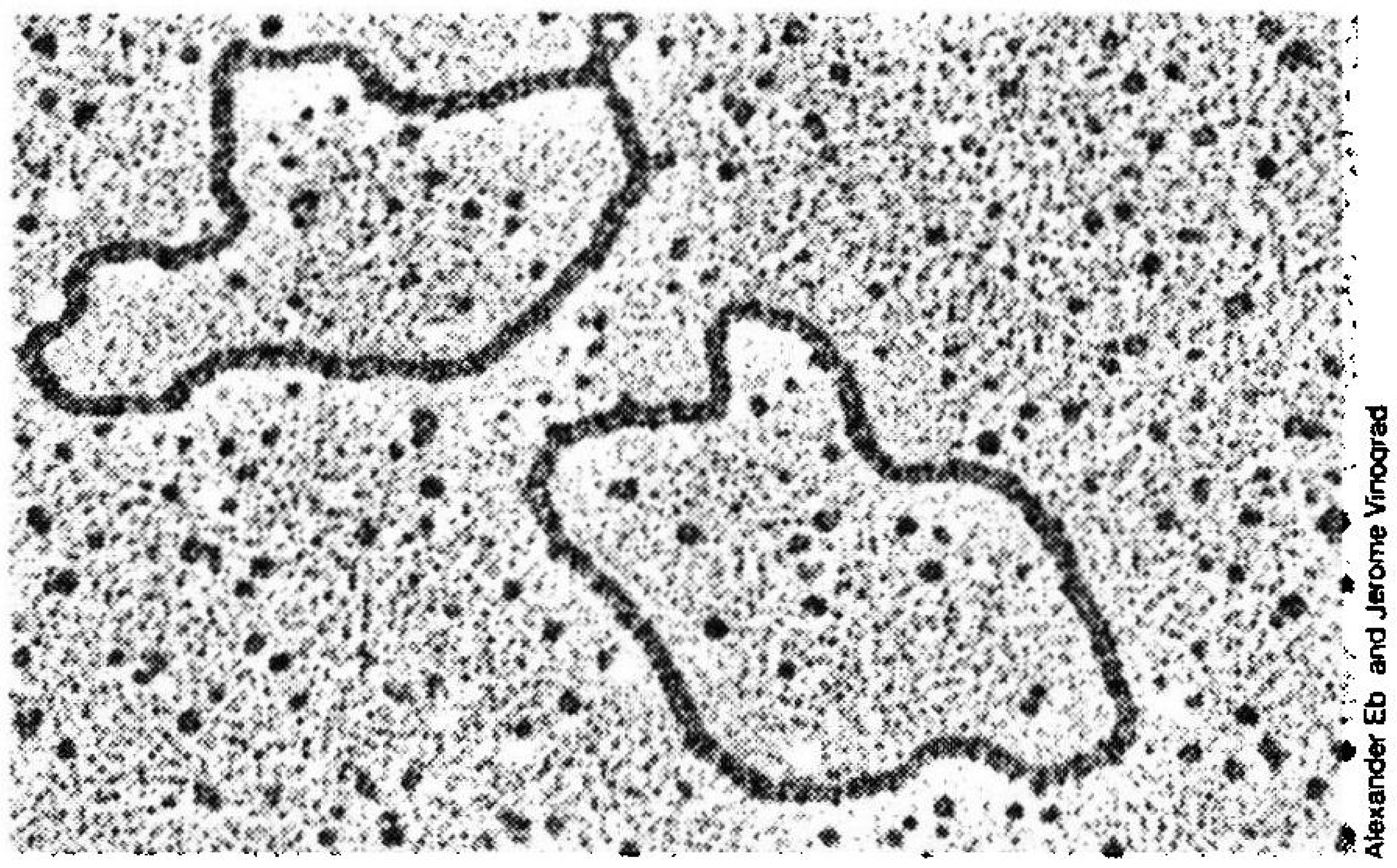


图 16.19　多瘤病毒。一种肿瘤病毒的松弛环状 DNA（非超螺旋）的电子显微镜照片。每个环的外形长度约 1.5μm。多瘤病毒 DNA 使用宿主 DNA 聚合酶在动物细胞中复制。

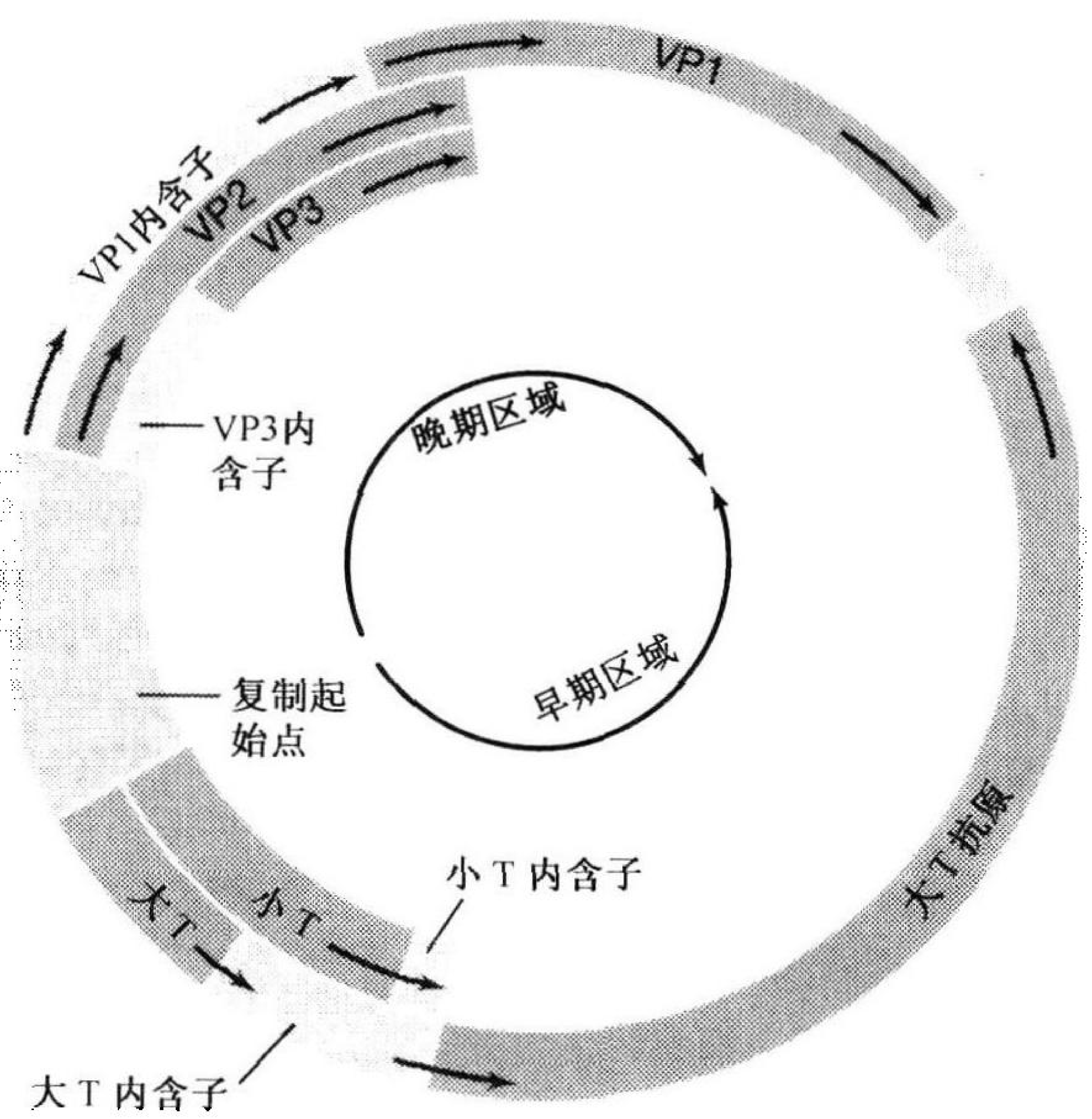


图 16.20　多瘤病毒 SV40 的基因图谱。VP1、VP2、VP3 分别编码构成 SV40 衣壳的 3 种蛋白质。箭头表示转录方向。注意编码 VP1、VP2、VP3 的基因是如何重叠的。

SV40 的 DNA 太小，不能编码 DNA 聚合酶，所以需要利用宿主的 DNA 聚合酶。复制方式是从单一复制起始点进行双向复制（图 7.16）。这个过程与已描述过的宿主细胞 DNA 的复制相同（见 7.5 节和 7.6 节）。

晚期 SV40 mRNA 分子的合成是利用早期 mRNA 合成时所用的互补链（图 16.20）。转录从复制起始点附近的启动子开始，转录物经剪切加帽和聚核苷酸化，形成对应于 3 种衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3 的多种类型的 mRNA。有趣的是，编码这些蛋白的基因相互重叠，即我们在这章反复讨论的基因重叠现象（图 16.20）（见 16.1 节、16.2 节、16.4 节）。SV40 衣壳蛋白的 mRNA 转运到细胞质并翻译出衣壳蛋白。衣壳蛋白再被转运回细胞核，在那里组装成病毒粒子。SV40 颗粒由细胞裂解释放出来。

一些多瘤病毒会引发肿瘤。多瘤病毒感染宿主细胞后依据宿主细胞类型的不同会发

生两种模式的复制。在某些非限制性宿主细胞中，病毒感染后形成新的病毒粒子并使宿主细胞裂解。在另一些限制性宿主细胞中，则不发生有效地增殖，但病毒 DNA 会整合到宿主细胞，类似于原噬菌体（见 9.10 节），在此过程中细胞发生遗传改变（图 16.21）。这些细胞通常失去了生长抑制因子而转化为肿瘤细胞，这一过程称为转化（transformation）（图 9.24）。对于一些致瘤反转录病毒（见 9.13 节和 16.15 节）中，特异多瘤基因的表达导致细胞进入转化阶段（图 16.21）。

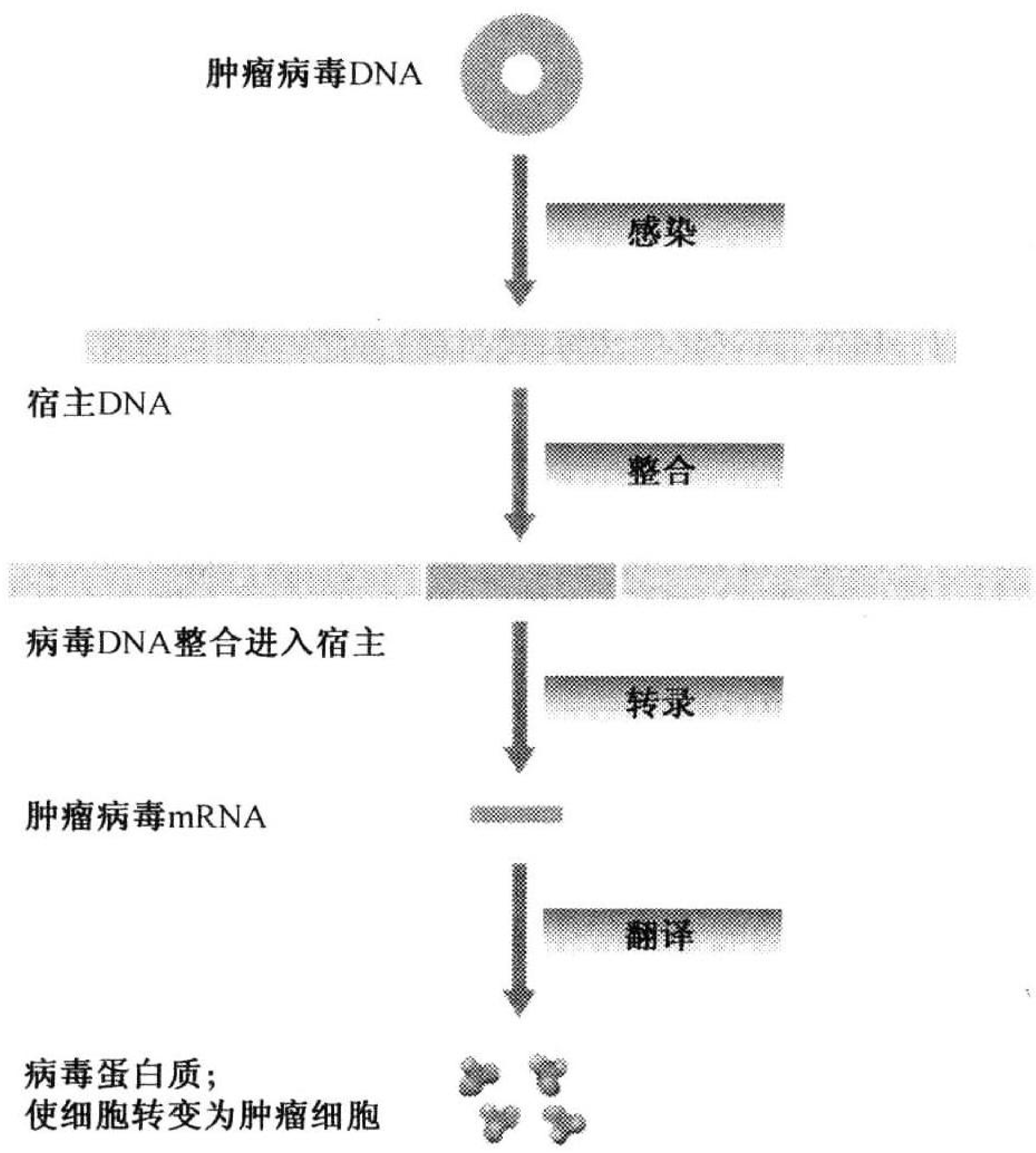


图 16.21　多瘤病毒如 SV40 引起细胞转化时的分子变化模式图。全部或部分病毒 DNA 整合入宿主 DNA。编码转化信息的病毒基因被转录加工成病毒 mRNA，并运至细胞质，被翻译成转化蛋白，具有使正常宿主细胞转化为肿瘤细胞的功能（图 9.24）。

概念检查

大多数动物双链 DNA 病毒如 SV40 在细胞核中复制。SV40 基因组很小，引入了重叠基因机制增加基因编码的多样性，一些病毒可引发肿瘤。

◆ 为什么 SV40 的病毒粒子中没有像流感病毒那样携带酶？

◆ SV40 的一个转录物如何产生更多的 mRNA？

16.12　双链 DNA 病毒：疱疹病毒

疱疹病毒（herpesvirus）是双链 DNA 病毒中很大的一个类群，可引起人和动物的多种疾病，包括唇疱疹、生殖器疱疹、水痘、带状疱疹，以及传染性单核细胞增多症；这些疾病在第 26 章中讨论。疱疹病毒一个比较有趣的特征是能在人体中潜伏相当长的

时间，在外界条件的激发下被激活。引起唇疱疹的单纯疱疹病毒（herpes simplex virus）和引起水痘和带状疱疹的水痘-带状疱疹病毒（varicell-zoster virus），都能潜伏在感觉神经元中，并引起皮肤感染。

疱疹病毒中的一个重要类群是致癌性的，引起临床上的癌症。其中一种是非洲淋巴瘤病毒（Epstsin-Barr virus），引起伯基特氏淋巴瘤（Burkltt's lymphoma），是中非和新几内亚儿童中常见的肿瘤。伯基特氏淋巴瘤是较早发现的与病毒感染有关的人类癌症。非洲淋巴瘤病毒同样引起人类非恶性的一般不适病症，称为感染性单核细胞增多症（infectious mononucleosis）。

疱疹病毒：一般性质

疱疹病毒粒子的结构很复杂，由 4 种不同的形态学单位组成。单纯疱疹病毒 I 型有

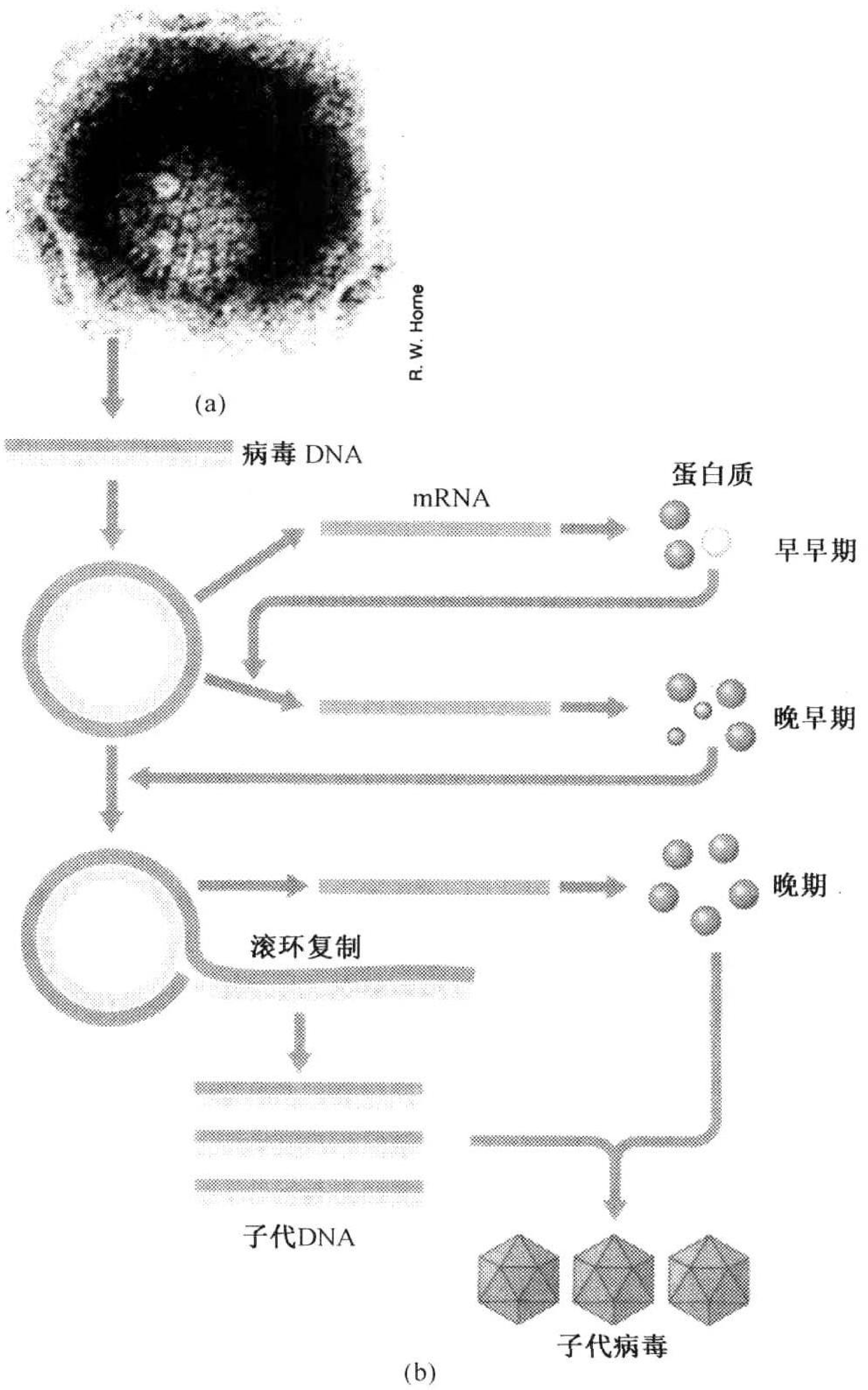


图 16.22 疱疹病毒。单纯疱疹病毒的复制过程，自疱疹病毒颗粒的电子显微镜照片起始，颗粒直径约 150nm。疱疹病毒 DNA 的复制在细胞核内由病毒 DNA 聚合酶完成。

囊膜，直径 150nm（图 16.22a），病毒的中心是一个电子致密的核心，由线状双链 DNA 组成。核心周围是二十面体对称的核衣壳，由 162 个衣壳粒构成，每个衣壳粒由多种不同的蛋白质组成。核衣壳外包裹着不定型的外被，是一种独特的羽状组织。它的外面才是囊膜，表面上有许多小刺突。

病毒粒子中有许多种不同的蛋白质，但并非所有蛋白质都已鉴定。单纯疱疹病毒 I 型的基因组是一个大的线性双链 DNA 分子，152 260bp（比 SV40 基因组大 30 倍）。单纯疱疹病毒的 DNA 序列编码至少 84 种不同的多肽。

疱疹病毒感染与复制

病毒粒子通过吸附在特异性的细胞受体上发生感染，然后细胞质膜与病毒囊膜融合，核衣壳释放到细胞当中，并运输到细胞核，病毒 DNA 脱衣壳。病毒粒子的蛋白质抑制了宿主大分子的合成。

感染后合成 3 种信使 RNA：早早期，编码 5 种调节蛋白；晚早期，编码与复制有关的蛋白质，包括 DNA 聚合酶；晚期，编码结构蛋白（图 16.22b）。在早早期，1/3 的病毒基因组在宿主 RNA 聚合酶的作用下被转录，编码正调控蛋白，激活晚早期蛋白质的合成。晚早期，必须在早早期蛋白质合成之后。在此阶段，病毒基因组的 40%被转录。在晚早期合成的多种重要蛋白质中有一类病毒特异性 DNA 聚合酶和 DNA 结合蛋白，它们参与病毒 DNA 的复制。

疱疹病毒 DNA 的合成发生在细胞核中。感染发生后，病毒基因组环化（类似 λ 噬菌体，见 9.11 节），并以滚环机制进行复制（图 9.20）。共有 3 个起始点，在装配自身的过程中长的多联体被切割成病毒长度的 DNA，类似于描述的 DNA 噬菌体（见 9.9 节和 16.4 节）。

核衣壳在细胞核中装配，从核内膜出芽的过程中获得囊膜。成熟的病毒粒子从内质网释放到细胞外。这种有囊膜的 DNA 病毒是在细胞核膜上装配，这与有囊膜的 RNA 病毒在细胞质膜上装配有很大不同。

巨细胞病毒

一种主要的广泛传播的疱疹病毒是巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）。CMV 的复制如同典型的疱疹病毒，它在美国 40 岁左右人群中的出现率为 50%～85%。健康个体感染 CMV 后无明显症状或能在很长一段时间内保持健康。然而，CMV 能引起免疫抑制个体的严重疾病，包括接受免疫抑制药物治疗的患者（如器官移植、癌症、透析患者）和感染 HIV 的 AIDS 病患。CMV 可引起这些人肺炎、视网膜炎和胃肠疾病，并且发病偶然、剧烈，可引起感染者的死亡。

健康宿主的免疫系统能够控制 CMV。然而，CMV 在宿主细胞中保持休眠状态直至免疫系统受到抑制而被激活，导致身体各处温和或剧烈的症状，症状严重程度取决于机体免疫系统的控制程度。与非洲淋巴瘤病毒相似，CMV 也能引起感染性单核细胞增多症。

概念检查

疱疹病毒是大双链 DNA 病毒，病毒 DNA 为环状，通过滚环机制复制，能引起多种疾病综合征，而且能在宿主中维持潜伏状态，定期起始病毒复制。

- *疱疹病毒复制之前环化的作用是什么？*
- *疱疹病毒核衣壳在何处组装？并且如何影响囊膜的蛋白质组装？*

16.13 双链 DNA 病毒：痘病毒

痘病毒（pox virus）是已知的最复杂、最大的动物病毒（图 16.23）。它还有一个特点：虽然它们是 DNA 病毒，但却在细胞质中复制。因此，受痘病毒感染的宿主细胞表现为在细胞核外进行 DNA 的合成，而其他一些过程只在真核细胞的细胞器内进行。

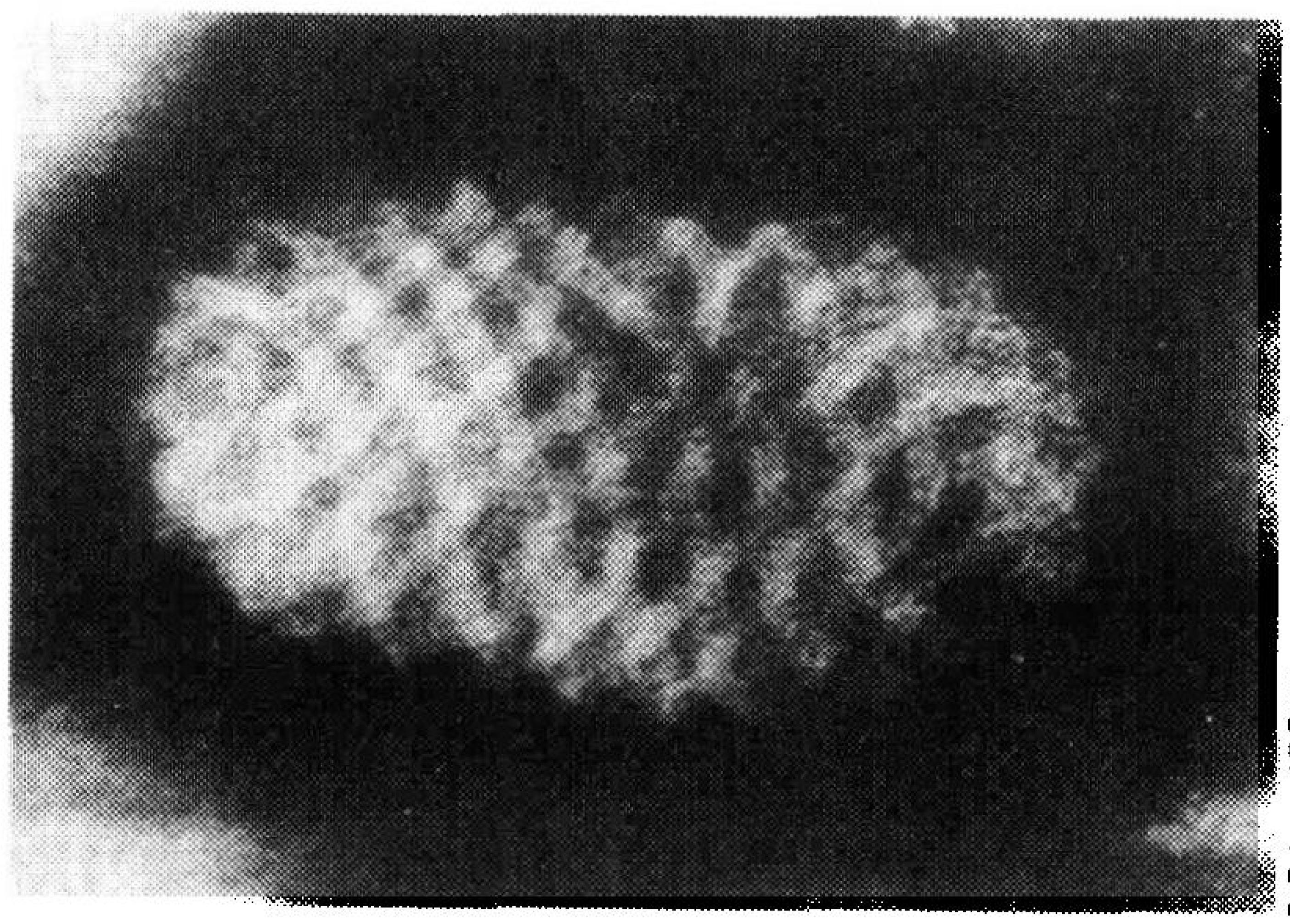


图 16.23 痘病毒。痘病毒颗粒的负染电子显微镜照片。颗粒长大约 400nm（0.4μm）。痘苗病毒常被用作天花疫苗和基因改造过的疫苗（见 31.8 节）。

痘病毒的一般性质

痘病毒曾在医学上有着重要意义。天花病毒是最早被深入研究的，而且也是最早被用来研制成疫苗的病毒（Edward Jenner，1798）。随着疫苗的广泛应用，天花是第一个被消灭的疾病。其他一些重要的痘病毒有牛痘病毒，还有兔黏液瘤病毒，这是兔的一种重要致病因子，也被用来人为地控制澳大利亚兔群密度（见 25.5 节）。有些痘病毒引起肿瘤。

痘病毒很大，以至于可以在光镜下观察到。科学家对痘苗病毒（vaccinia virus）已做了大量的研究工作。痘苗病毒粒子是长方形的，大小为 400nm×240nm×200nm（图 16.23）。病毒粒子最外层是由微管和微丝排列成的类似膜的结构，外膜是由蛋白质组成的，不含有脂质（图 16.23）。粒子内有两个侧体，成分未知。还有核衣壳构成的核心，核衣壳由 DNA 被外层蛋白质亚单位环绕组成。

痘病毒基因组是双链线性 DNA。痘苗病毒基因组长约 185kb，含有大约 180 个基因。双链末端通过磷酸二酯键形成交联，与先前讨论的小球藻病毒十分相似（见 16.7 节）。

痘病毒的复制

痘苗病毒粒子被细胞以一种吞噬作用摄入进去，核心进入到细胞质中。有趣的是，病毒基因组的脱壳必须在一种新的蛋白质合成以后才能进行。这种蛋白质由病毒 DNA 编码，该基因由病毒颗粒内的 RNA 聚合酶来转录。当这一脱壳基因转录后，其他许多病毒基因也被转录出来。初始转录物还在核心当中时就被加上帽结构并被聚腺苷酸化作用转变为 mRNA，基因复制由病毒编码的 DNA 聚合酶合成。

一旦痘病毒 DNA 完全发生脱壳化，就开始在细胞质中形成包含体。在包含体当中进行子代病毒粒子的转录、复制及壳体化。每个感染病毒粒子都会形成自身的包含体，因此包含体的数目与感染多样性有关。子代 DNA 分子形成一个库，从这里单个的分子被包装到病毒粒子当中。成熟的病毒粒子在细胞质中积累。似乎没有特异性的释放机制，大多数病毒是在被感染细胞裂解时释放出去。

痘病毒和重组疫苗

痘苗病毒可以作为宿主表达其他病毒的遗传改造蛋白质，从而构建出遗传工程疫苗（见 31.8 节）。我们将在第 22 章中看到，疫苗就是能在动物中引发免疫反应的一种物质，使动物免受同种因子的感染。痘苗病毒对人体没有严重的损伤，但是有高度的免疫原性。因此，作为携带感染性病毒的蛋白质疫苗，能够安全有效地激活免疫反应。

用分子克隆（见第 10 章和第 31 章）的方法已能够在痘苗病毒中表达流感病毒、狂犬病病毒、单纯疱疹病毒 I 型及乙肝病毒的关键蛋白质，并能用作疫苗（见 31.8 节）。还有一种类似的疫苗系统是以腺病毒为载体发展起来的（见 16.14 节）。与痘苗病毒类似，腺病毒对人类健康没有什么损害。

概念检查

痘病毒不同于其他讨论过的 DNA 病毒，它们非常大，并全部在细胞质中复制，这些病毒引起多种人类疾病，但是，疫苗的诞生已在世界范围内消灭了天花。

◆ 为什么痘病毒在细胞质中复制 DNA 值得关注？

◆ 基因工程中如何利用痘病毒？

16.14 双链 DNA 病毒：腺病毒

腺病毒（adenovirus）是线性双链 DNA 病毒中的重要类群，有着独特的分子生物学特性。“adeno”是从拉丁文“gland”（腺体）衍生而来，这类病毒最初是从人的扁桃体和腺样体中分离得到的。腺病毒通常引起人轻微的呼吸道感染，许多这类病毒是从健康人体中分离出来的。腺病毒的基因组是线性双链 DNA，约 36kb。DNA 5′端共价连接

着一种蛋白质，称作末端蛋白，对 DNA 的复制是必需的。DNA 分子末端还有 100～180bp 的反向重复序列（因病毒株系不同而不同），在复制中起重要作用。

腺病毒的复制：早期

腺病毒 DNA 的复制有别于痘病毒，是在细胞核中进行的（图 16.24）。当病毒颗粒转运到细胞核时，核心部分被释放出来，形成一种病毒 DNA-组蛋白的复合物。在宿主 RNA 聚合酶的作用下开始早期转录，产生许多初始转录物，转录物中含有内含子，必须被剪切为成熟转录本，然后在翻译前被加帽和多聚腺苷化。

早期蛋白质参与 DNA 复制的调节，晚期蛋白质是病毒的结构蛋白。病毒 DNA 的复制是以末端蛋白作引物，另外一种病毒编码的蛋白质作为 DNA 聚合酶。末端蛋白包含复制过程中的共价结合的胞嘧啶。

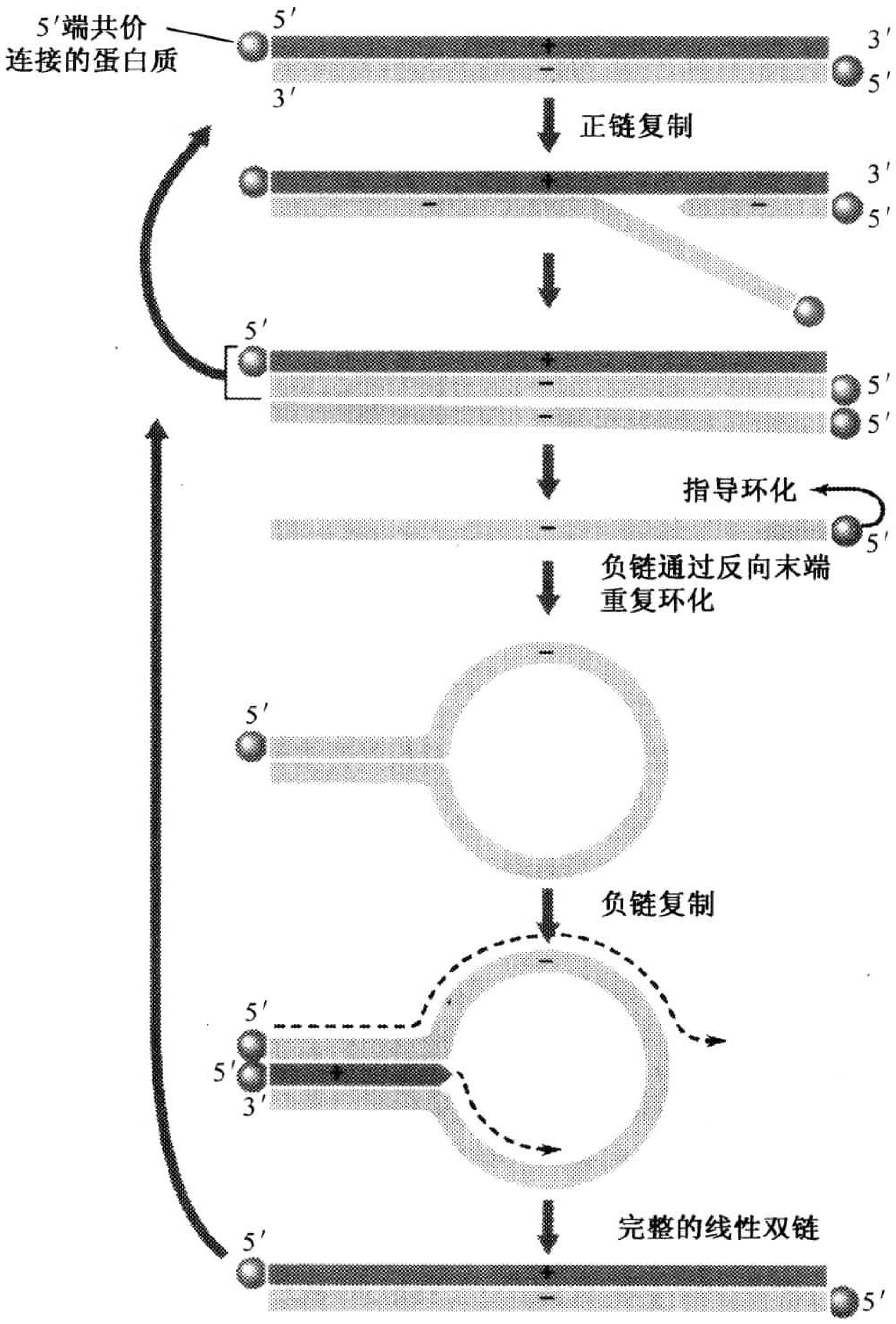


图 16.24　腺病毒 DNA 的复制。由于环化，复制没有后滞链，合成在两条链同时进行。

腺病毒的复制：基因组复制

腺病毒是从任意一个末端开始复制的，两条链的复制不是同时发生的（图 16.24）。一个复制循环的产物是一个双链分子和一个单链分子（图 16.24）。而后采用一个独特的复制机制，单链分子的反向重复末端结合形成环状，然后以 5′端开始合成新的互补链（图 16.24）。这种复制机制的特点是在后滞链上并不形成不连续的 DNA 片段（见 7.6 节），而是两条新链都以先导方式合成（图 16.24）。

概念检查

不同双链 DNA 动物病毒有不同的基因组复制机制，腺病毒以蛋白质作引物，并且避免产生不连续的 DNA 片段，复制过程在细胞核中进行。

◆ 描述腺病毒如何在不合成不连续 DNA 片段的情况下完成它双链 DNA 复制？

16.15 采用反转录机制的病毒：反转录病毒和嗜肝 DNA 病毒

我们在 9.12 节讨论过反转录病毒（retrovirus），它们是一类使用反转录酶通过反转录（reverse transcription）方式进行复制的病毒。有两种类型的病毒利用反转录酶，它们的区别在于基因组中核酸的类型。反转录病毒有 RNA 基因组，嗜肝 DNA 病毒（hepadnavirus）含有 DNA 基因组。这一节我们将就这两种复制模式进行研究。

反转录病毒：一般法则

反转录病毒是有囊膜的病毒，基因组有两个拷贝的 RNA（图 9.24）。病毒颗粒中包含一些酶如反转录酶和一个特殊的 tRNA。这些酶在反转录病毒复制中是必要的，其原因是反转录病毒虽然含有加帽和尾的正链 RNA，但是不能直接作为 mRNA 使用。因此，基因组中一条 RNA 链被反转录为 DNA 并整合入宿主基因组。线性双链 DNA 分子在细胞质中的未脱壳核心病毒颗粒中合成。反转录的步骤见图 16.25。

反转录酶的活性

反转录酶主要是一种 DNA 聚合酶，但实际上，它表现出 3 种酶活性：①以 RNA 为模板合成 DNA（反转录）；②以 DNA 为模板合成 DNA；③核糖核酸酶 H 活性（降解 RNA：DNA 杂交链中的 RNA 链）。像所有 DNA 聚合酶一样，反转录酶在进行 DNA 合成时也需要引物，这种引物是特异的细胞内转运 RNA（tRNA）（图 16.25），用作引物的 tRNA 是从以前的宿主细胞带入病毒粒子的。

以 tRNA 为引物，RNA 5′端的 100 个左右的核苷酸被反转录成 DNA。当转录物到达 RNA 5′端时，转录就停止了。剩余的大部分 RNA 的复制以一种不同的机制进行。首先，RNA 5′端的冗余序列在反转录酶的核糖核酸酶 H 作用下被切除。于是在新合成的单链 DNA 上出现了与病毒 RNA 另一个末端互补的小片段，这个小片段单链 DNA 与 RNA 另一末端结合，并继续进行复制。

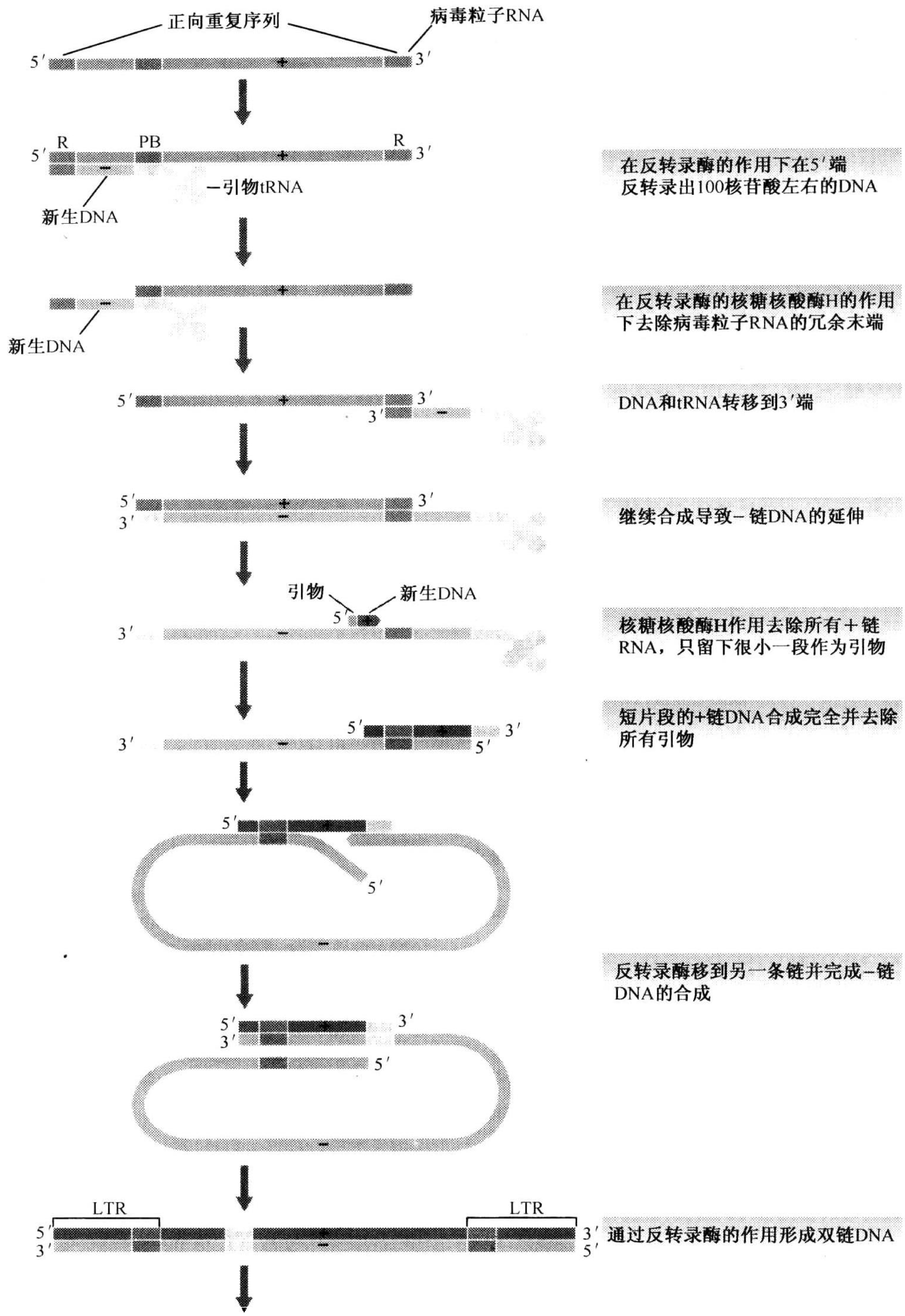


图 16.25　从反转录病毒的单链 RNA 形成双链 DNA 的整个步骤。 RNA 的两端标记为 R 的序列是正向重复的。PB 是引物（tRNA）结合序列。注意 DNA 合成的过程中在 DNA 上产生了比原来 RNA 上更长的正向重复，称为长末端重复序列（LTR）。

如图 16.25，在反转录酶和核糖核酸酶 H 作用下形成的双链 DNA 每个末端都具有长末端重复序列（LTR）。这些 LTR 含有转录强启动子而且参与整合过程。病毒 DNA 整合到宿主基因组中的过程与 Mu（见 16.5 节）的整合类似。整合可以发生在细胞 DNA 上的任何位置，一旦整合发生，形成的原病毒（provirus）就成为稳定的遗传因子（图 16.25）。

反转录病毒基因表达、加工和毒粒组装

在原病毒阶段，反转录病毒基因组可能表达或停留在潜伏期不表达。如果右端的 LTR 启动子被激活，整合的原病毒 DNA 就在细胞 RNA 聚合酶的作用下转录，转录物被加帽和 poly A 尾巴，这些转录物可以被壳体化成为新的病毒粒子，或者被翻译成病

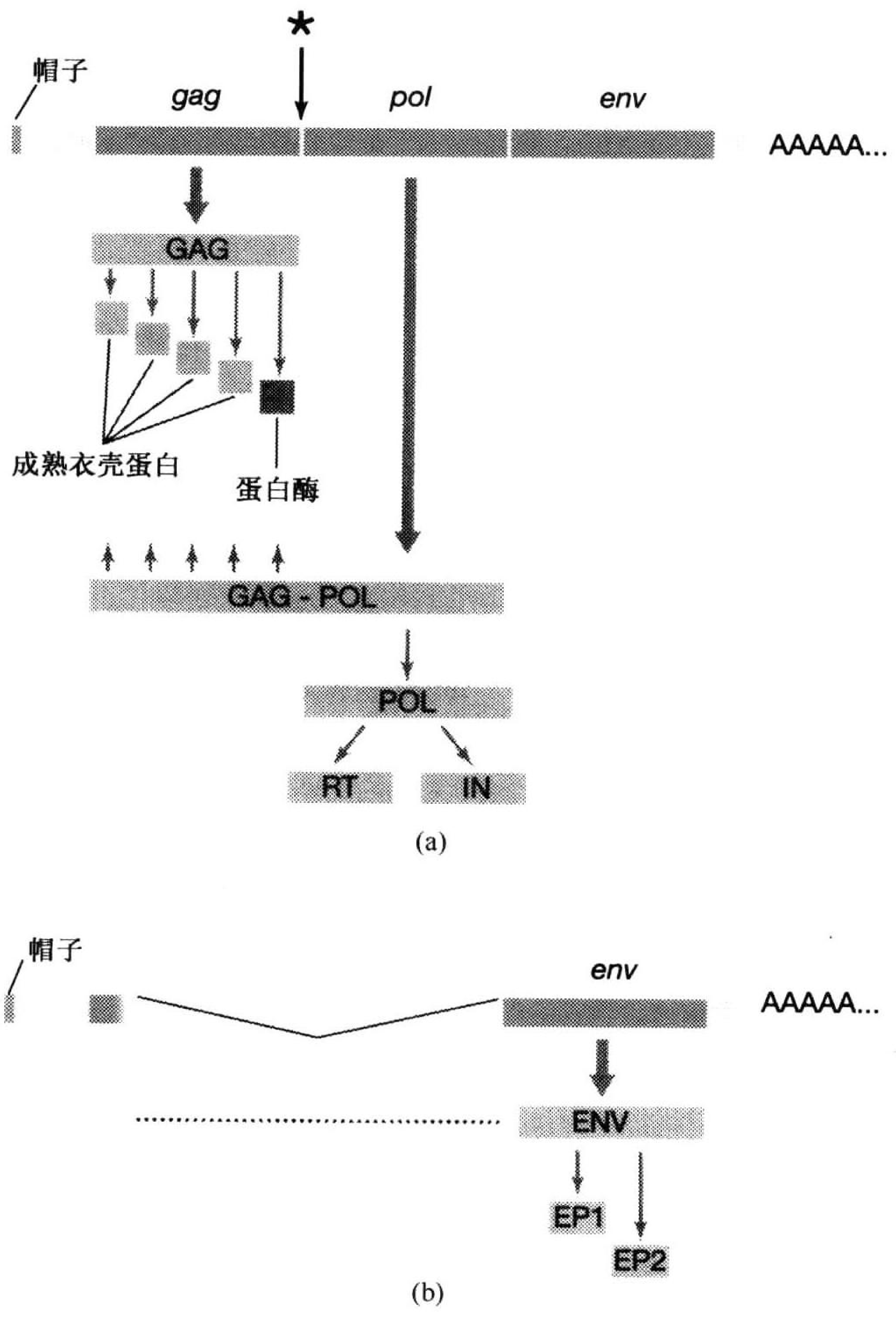


图 16.26 反转录病毒 mRNA 翻译及蛋白加工。（a）最上面的是有 *gag*、*pol*、*env* 三个基因的 mRNA。星号表示在该位点核糖体通读终止密码子及做精确移码以合成 GAG-POL 多聚蛋白。蓝色粗箭头表示翻译，蓝色细箭头表示蛋白质加工。*gag* 基因的一个产物是蛋白酶。POL 被加工为反转录酶（RT）和整合酶（IN）。（b）mRNA 被加工除去大部分 *gag-pol* 区。这一截短的 mRNA 翻译为 ENV 多聚蛋白，之后被切割为两个囊膜蛋白（EP），EP1 和 EP2。

毒的蛋白质。

图 16.26 示反转录病毒的 mRNA 的翻译和加工过程。所有反转录病毒至少含有 3 个基因：*gag*、*pol* 和 *env* 并按此顺序排布在基因组上。*gag* 基因位于 mRNA 的 5′端，编码许多小的病毒结构蛋白。它们首先合成为多聚蛋白，而后被蛋白酶（本身是多聚蛋白的一部分）加工。这些结构蛋白组成衣壳，蛋白酶包裹于病毒颗粒中。

接下来基因 *pol* 被翻译成包含 gag 蛋白的多聚蛋白（图 16.26）。与结构蛋白相比，*pol* 的产物的需要量很小，它的合成需要核糖体出错。为了产生 *pol* 基因产物，核糖体要越过 *gag* 基因末端的终止密码子，或者要精确的转换至另一可读框。这些是非常稀有的事件。

pol 基因产物生产出来后通过两种方式加工。①从 Gag 蛋白上移除；②反转录酶从整合酶上切下，整合酶是 DNA 整合作用所需的一种蛋白质，它与反转录酶一同被包装在病毒颗粒中（图 16.26）。为了翻译 *env* 基因，全长 mRNA 需要事先移除 *gag* 和 *pol* 区域。*env* 产物产生后被加工成两种不同的囊膜蛋白（图 16.26）。

反转录病毒 HIV

虽然以上描述的反转录病毒的复制模式非常复杂，实际上这是典型（简单）反转录病毒的模式。相比之下，引起 AIDS 的人免疫缺陷病毒 1（human immunodeficiency virus 1，HIV-1）的基因组包括许多额外的小基因。它的表达同时需要蛋白酶的严密加工和内含子的选择性剪切。然而，反转录病毒的一个标志是在形成成熟蛋白过程中包括许多蛋白酶阶段。鉴于此，特异蛋白酶的抑制剂被开发用于治疗包括 HIV-1 在内的反转录病毒感染（见 20.10 节和 26.14 节）。

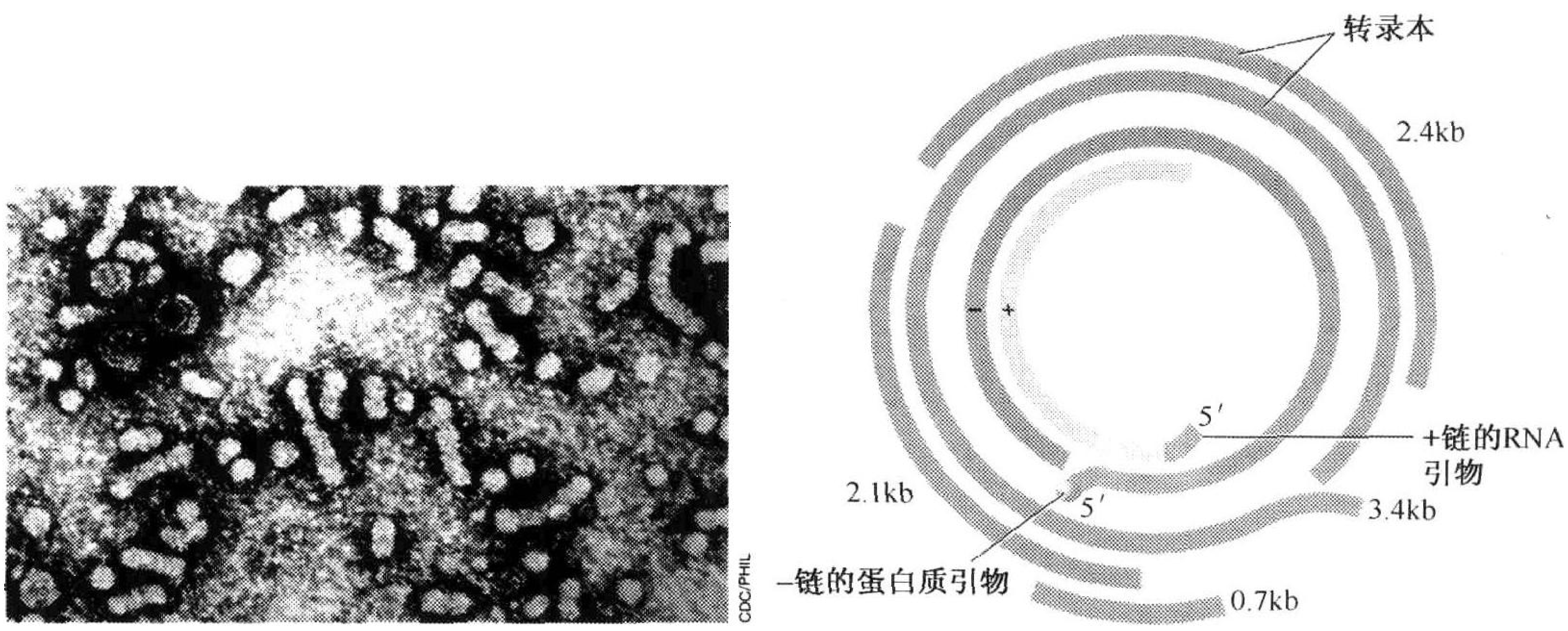
DNA 反转录病毒：嗜肝 DNA 病毒

我们已经看到病毒的生活周期显示出许多无法预料的基因组结构和复制方案。但是没有一个比嗜肝 DNA 病毒（hepadnavirus）更为奇特，如人类乙型肝炎病毒，一种严重的血液病原体（见 26.11 节）。“hepadnavirus”一词源于此病毒感染肝脏（hepa）和基因组成分为 DNA（dna）。乙型肝炎病毒的颗粒是很小的无规则的棒状颗粒（图 16.27a）。

嗜肝 DNA 病毒基因组是已知的病毒中最小的，大小为 3～4kb，同时病毒的生活周期也是独特而复杂的。嗜肝 DNA 病毒在复制周期中如同反转录病毒一样使用反转录酶。然而，不同于反转录病毒，DNA 基因组的嗜肝 DNA 病毒复制通过 RNA 作为中介，这点与反转录病毒正好相反。

嗜肝 DNA 病毒的基因组只是部分双链 DNA（图 16.27b）。其中一条链不完整，两条链都有缺口。不过，两条链通过互补链之间的氢键形成环状。一旦进入细胞质，病毒携带的 DNA 聚合酶完成 DNA 分子的复制。这个聚合酶是一种非常多效的蛋白质，它具有 DNA 聚合酶及反转录酶活性，同时可作为引物用于一条 DNA 链的合成。虽然基因组很小，它却编码许多蛋白质，小病毒广泛使用的重叠基因机制（见 16.21 节、16.2 节、16.4 节）再次出现于嗜肝 DNA 病毒中（图 16.27b）。

嗜肝 DNA 病毒基因组的复制包含使用宿主 RNA 聚合酶的转录过程（核中进行），



(a) (b)

图 16.27 嗜肝 DNA 病毒。（a）乙肝病毒颗粒的电子显微镜照片。（b）乙肝病毒基因组。部分双链基因组用绿色表示。正链是不完整的。转录本的大小显示出来。乙肝病毒的所有基因都是重叠的，覆盖了基因组中每个碱基。宿主 RNA 聚合酶产生一个基因组全长 mRNA，反转录酶从全长 mRNA 产生 DNA 基因组。

产生具有末端重复的转录本（图 16.27b）。重复序列的形成是由于聚合酶多次经过环状分子。病毒反转录酶接着将它转为 DNA，这与反转录病毒的复制十分相似，但是此时 DNA（而不是反转录病毒中的 RNA）被包入新生病毒颗粒中（图 16.27b）。

嗜肝 DNA 病毒是典型的最大限度的利用其小基因组的例子。例如，乙型肝炎病毒基因组只有 3.4kb，比任何单链 RNA 或 DNA 噬菌体都要小（见 16.1～16.3 节）。不过，这个小病毒却能引起严重的人类疾病，我们将在后续章节探讨肝炎综合征（见 26.11 节）。

概念检查

反转录病毒含有 RNA 基因组并使用反转录酶在生活周期中产生 DNA 拷贝。嗜肝 DNA 病毒含有 DNA 基因组，使用反转录酶由 RNA 拷贝形成基因组 DNA。两种病毒都具有复杂的基因表达模式。

◆ 为什么蛋白酶抑制剂能作为治疗人类 AIDS 的有效手段？

◆ 描述反转录酶在反转录病毒和嗜肝 DNA 病毒复制周期中的不同作用。

复习题

1. 描述在病毒中发现的基因组类型。每种类型中列举至少一种或一类病毒为例。（整章内容）
2. 什么是重叠基因？请列举一些有重叠基因的病毒。（见 16.1 节、16.2 节、16.4 节、16.11 节和 16.15 节）
3. 许多噬菌体的基因组为单链 DNA，它们的基因是如何进行转录和翻译的？（见 16.2

节和 16.3 节）

4. 细菌、植物和动物病毒中有很多正链 RNA 病毒，这些病毒之间，特别是细菌和真核细胞的这类病毒之间的主要区别是什么？（见 16.1 节和 16.8 节）
5. T7 噬菌体在侵染宿主时其基因组总是一端先进入宿主，这对于侵染过程是必需的，为什么？（见 16.4 节）
6. Mu 噬菌体为什么容易变异？其哪些特征是 Mu 插入宿主 DNA 所必需的？（见 16.5 节）
7. 古生菌病毒如 PAV-1 的基因组和双链 DNA 噬菌体的基因组相比有什么独特之处？（见 16.6 节）
8. 烟草花叶病毒的基因组是哪种类型？从结构和大小上来讲，其与小球藻病毒有何异同？（见 16.7 节）
9. 脊髓灰质炎病毒的 VPg 蛋白有何功能？基因组同样是正链 RNA 的冠状病毒没有 VPg 蛋白，它是如何进行自身基因组的复制的？（见 16.8 节）
10. 弹状病毒基因组结构很有特点，它有什么自然特性？为什么在其病毒颗粒中包含着一个复制相关的酶？（见 16.9 节）
11. 呼肠孤病毒的基因组在生物界是独一无二的，试解释。（见 16.10 节）
12. 虽然动物病毒不像噬菌体一样有温和型的，但许多可以在宿主体内进行潜伏感染，任举两例。（见 16.11 节和 16.15 节）
13. 疱疹病毒和腺病毒的基因组同为双链 DNA，但它们的复制过程有很大差异，请对此进行详细阐述。（见 16.12 节和 16.14 节）
14. 在所有双链 DNA 动物病毒中，痘病毒以其独特的复制过程著称，这一独特的过程是什么？如何在病毒颗粒中不含特殊酶类的情况下完成的？（见 16.13 节）
15. 反转录病毒复制过程很容易受到蛋白酶抑制剂的影响，这里所涉及的基因表达情况是怎样的？（见 16.15 节）

应用题

1. MS2 噬菌体 RNA 基因组编码的所有蛋白质并非都是等量合成的，为什么？其中一种蛋白质的功能与阻遏物相似，但在翻译水平上起作用（见 8.5 节），这是什么蛋白质？它如何行使功能？
2. 为什么许多双链 RNA 病毒的基因组是分节段的，具体有什么样的机制？
3. 在一些病毒中，它们基因组 DNA 两条链的复制都是连续的，如腺病毒，这与我们在第 7 章学过的“法则”——DNA 只能从 5′→3′复制矛盾吗？为什么？
4. 许多基因表达元件都使得反转录酶只进行少量的表达，或让其只是作为多聚蛋白的一部分行使功能，为什么？

（乔文涛 译，潘 皎 校）